

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Interação físico-química fármaco-polímero e efeitos correlatos sobre a solubilidade e atividade de griseofulvina sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*

VANESSA PITTOL

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Interação físico-química fármaco-polímero e efeitos correlatos sobre a solubilidade e atividade de griseofulvina sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*

Dissertação apresentada por
Vanessa Pittol para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23 de março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares
Universidade Federal de Pernambuco

Pittol, Vanessa

Interação físico-química fármaco-polímero e efeitos correlatos sobre a solubilidade e atividade de griseofulvina sobre isolados de Trichophyton mentagrophytes e Trichophyton rubrum. / Vanessa Pittol. -- 2016.

110 f.

Orientador: George González Ortega.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. polímero. 2. poloxâmero. 3. griseofulvina. 4. solubilização. I. González Ortega, George, orient. II. Título.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFRGS) e no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para
nossa busca contínua.”*

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. George González Ortega, pelo exemplo como profissional, pela oportunidade, pelo acolhimento e incentivo durante toda iniciação científica e mestrado. Pela compreensão e atenção, principalmente nos momentos de dificuldade. Pelos ensinamentos, conselhos, confiança, apoio e carinho. Enfim, fico imensamente grata por todos esses anos de convivência e amizade.

Aos meus pais Beatriz e Valmor, pelo exemplo, dedicação, incentivo e amor. Pelas constantes ligações, pelo apoio e, principalmente, por nunca me deixarem desistir.

Ao meu irmão Diego pelo carinho, amizade, companheirismo e ajuda.

Ao Rafa pela compreensão, principalmente na fase de escrita da dissertação, pelo carinho e amor.

Aos professores Letícia Koester, Helder Teixeira, Valquíria Bassani e Pedro Petrovick pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sem os quais a realização do trabalho teria sido mais difícil. Agradeço pela agradável convivência, parceria, apoio, ajuda, alegria, conversas e risadas.

Ao Samuel Kaiser pelo acolhimento, aprendizado, incentivo, amizade e ajuda desde o início da iniciação científica.

À Letícia Danielli pela ajuda, atenção, disposição e alegria durante a realização dos experimentos.

Aos meus colegas de faculdade, presentes da graduação, em especial, Joanna, Krista, Paula, Bruna, Felipe e Rose pela convivência, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas e risadas.

A todos que de alguma forma contribuíram, incentivaram e torceram para o meu trabalho e o meu crescimento.

RESUMO

Fármacos com escassa hidrossolubilidade, frequentemente, representam desafios para a indústria farmacêutica. A solubilidade é o principal fator limitante da sua dissolução e absorção, levando a uma biodisponibilidade inadequada e prejuízo da eficácia clínica. O uso de polímeros, baseado na interação fármaco-polímero, destaca-se entre as várias estratégias para melhorar a solubilidade de fármacos. Poloxâmeros são copolímeros anfifílicos que podem se autoassociar em solução aquosa, promovendo a solubilização de fármacos pouco solúveis através da solubilização micelar. Griseofulvina (GF) é fármaco que representa um exemplo típico de desafio para estudos de aumento de solubilidade, a fim de melhorar sua atividade antifúngica. Diversos estudos apontam o potencial uso de poloxâmeros na solubilização de fármacos, incluindo GF. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar a interação físico-química entre GF e o poloxâmero 407 (P407) e o efeito sobre a solubilidade do fármaco, avaliando *in vitro* a atividade de GF, na sua forma livre e associada ao P407, sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Para avaliar o teor de GF nas associações GF-P407, foi desenvolvido e validado método analítico por CLAE-PDA. Estudos de solubilização indicaram um aumento efetivo de, aproximadamente, oito vezes a solubilidade intrínseca de GF que seguiu, porém, um comportamento não linear, diferente do usualmente descrito na literatura. Os ensaios de caracterização físico-química por calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de infravermelho com *Transformada de Fourier*, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética indicaram a ocorrência de possíveis interações fármaco-polímero, contudo, não foram conclusivos. O teste de susceptibilidade fúngica revelou falta de correlação entre o incremento de solubilização de GF, mediado pela associação com P407, e sua atividade biológica, nos isolados testados.

Palavras-chave: polímero; poloxâmero; griseofulvina; solubilização; interação fármaco-polímero; atividade antifúngica.

ABSTRACT

Today more than ever, poorly soluble drugs (PSD) challenge the pharmaceutical industry regarding the development of more active pharmaceutical forms. Indeed, solubility is a limiting-step for drugs dissolution, absorption, bioavailability and the achievement of better clinical efficacy. Among the various strategies proposed to improve drug solubility, the solubilization through drug-polymer interaction have been a matter of special attention. Poloxamers are amphiphilic copolymers that self-associate in aqueous media, enhancing drug solubility via micellar solubilization. Griseofulvin (GF) exemplifies a typical case of challenge for increased solubility studies, to improve their activity. Former works noticed the potential use of poloxamers to enhance solubilization of PSD, including GF. In this work, we evaluated physicochemical characteristics of the GF-P407 interaction, and its influence on the GF solubility and GF *in vitro* antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. GF content in GF-P407 mixtures was assessed by a purposely developed and validated analytical method using HPLC-PDA. Solubilizing study indicated an effective solubilization of GF by poloxamer association. Nonetheless, the non-linear solubilization behavior have differed from that usually described in the literature for poloxamer. Results from physicochemical analysis by differential scanning calorimetry, Fourier transformed infrared spectroscopy, ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, scanning electron microscopy, photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility suggested a drug-polymer interaction, but were not conclusive. Noteworthy, the antifungal susceptibility testing showed a lack of correlation between the increased GF solubility and its biological activity. Thus, results suggest a possible interaction GF-P407, providing increased solubility of the drug, but not necessarily reflected in a higher antifungal activity of this association.

Key words: polymer; poloxamer; griseofulvin; solubilization; drug-polymer interaction; antifungal activity

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Determinação da precisão do método analítico através de avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.....	71
Tabela 2. Recuperação (%) de padrão de GF em matriz contendo mistura de GF com polímero (P407).....	71
Tabela 3. Robustez do método analítico em relação à variação de proporção de acetonitrila, temperatura de forno, fluxo de eluente e comprimento de onda.....	72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Estrutura química dos copolímeros tribloco – poloxâmeros.....	48
Figura 2.	Estrutura química do antifúngico GF.....	48

CAPÍTULO II

Figura 1.	Estrutura química de GF.....	64
Figura 2.	Curva analítica de concentração de GF <i>versus</i> área do pico.....	69
Figura 3.	Cromatograma obtido por CLAE-PDA para (A) mistura de GF e P407, (B) P407 e (C) diluente (acetonitrila:água).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AAH	Análise de aglomeração hierárquica
ACP	Análise de componentes principais
BCS	<i>Biopharmaceuticals Classification System</i>
CLAE – PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência – detector de arranjo fotodiodo
CMC	Concentração micelar crítica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT – IR	Espectroscopia de infravermelho com <i>Transformada de Fourier</i>
GF	Griseofulvina
GF-P407	Associação griseofulvina e poloxâmero 407
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
¹ H NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IPD	Índice de polidispersão
OE	Óxido de etileno
OP	Óxido de propileno
PC	Principal componente
PDI	Polydispersity index
Potencial ζ	Potencial zeta
PSD	<i>Poorly soluble drugs</i>
P407	Poloxâmero 407
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REFERÊNCIAS	29
OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos.....	35
CAPÍTULO I: Revisão da Literatura	37
Solubilidade	39
Solubilização com polímero - Dispersão sólida.....	41
Solubilização com polímero - Solubilização micelar e micelas poliméricas	43
Polímeros – Poloxâmeros	45
Griseofulvina.....	48
Dermatomicoses e Dermatófitos.....	49
Tratamento.....	51
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO II: Desenvolvimento e validação de método analítico rápido por CLAE-PDA para quantificação de griseofulvina em estudos de solubilização com poloxâmeros	61
Desenvolvimento e validação de método analítico rápido por CLAE-PDA para quantificação de griseofulvina em estudos de solubilização com poloxâmeros	63
Introdução.....	64
Metodologia	65
Resultados e Discussão	68
Conclusão.....	72
Referências.....	73
DISCUSSÃO GERAL	99
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	109

INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos comercializados e 80% das substâncias em processo de desenvolvimento correspondam a moléculas com limitada solubilidade aquosa (TAKAGI et al., 2006; KAWABATA et al., 2011; KHADKA et al., 2014; KALEPU; NEKKANTI, 2015). Fármacos com solubilidade limitada em meio aquoso, frequentemente, representam desafios para a indústria farmacêutica, uma vez que essa característica é reiteradamente o principal fator limitante da dissolução e absorção desses, levando a uma biodisponibilidade inadequada (KAWABATA et al., 2011; FLORENCE; ATTWOOD, 2011; BUCKLEY et al., 2013; KHADKA et al., 2014). Dessa forma, a escassa solubilidade pode afetar a interpretação dos ensaios realizados *in vitro*, levando a dados questionáveis e incorretos, comprometendo o desenvolvimento de novas formulações com adequada eficácia clínica (KAWABATA et al., 2011; LU; PARK, 2013).

Nesse contexto, constata-se o aumento do interesse na alteração da solubilidade de fármacos ou moléculas candidatas e, também, de novas abordagens que resultem na preparação de medicamentos mais eficazes (REKATAS et al., 2001; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

Entre as diversas estratégias para melhorar a solubilidade de fármacos insolúveis, destaca-se a solubilização mediante o uso de micelas e estruturas supramicelares de natureza polimérica, e sua posterior incorporação em formas farmacêuticas líquidas e semissólidas (REKATAS et al., 2001; LETCHFORD; BURT, 2007). As micelas poliméricas se originam da autoassociação espontânea de polímeros anfifílicos e caracterizam-se por apresentar um domínio externo hidrofílico e um domínio interno lipofílico, possibilitando, assim, a solubilização de fármacos pouco solúveis em veículos hidrofílicos (REKATAS et al., 2001; PIERRI; AVGOUSTAKIS, 2005; LETCHFORD; BURT, 2007).

Os copolímeros tribloco são formados por sequências de monômeros ligados covalentemente e podem ser compostos por dois blocos idênticos separados por um bloco diferente ou por três blocos diferentes (JONES; LEROUX, 1999; BATES et al., 2012; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014). Dentro deste grupo encontram-se os poloxâmeros, polímeros constituídos de unidades óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) dispostas em uma estrutura $OE_x-OP_y-OE_x$. Devido a sua estrutura, podem se autoassociar em meio aquoso, originando micelas com um domínio hidrofóbico (OP) e um domínio hidrofílico (OE) (REKATAS et al., 2001; DUMORTIER

et al., 2006). O poloxâmico 407 (P407) vem sendo amplamente estudado como solubilizante, sendo reconhecido por agências reguladoras, como o FDA (Food and Drug Administration), e utilizado na formulação de formas farmacêuticas de uso oral, tópico e oftálmico (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2005; JINDAL; MEHTA, 2015).

Igualmente abundante é o número de estudos que abordam a questão da baixa solubilidade de alguns fármacos, buscando por estratégias que modifiquem essa característica (KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013; KALEPU; NEKKANTI, 2015). No entanto, verificou-se que esses estudos se limitam, majoritariamente, a aspectos físico-químicos e tecnológicos, alguns *in silico*, presumindo um elo automático entre aumento na solubilidade e melhor atividade biológica, mas desprovidos de comprovação experimental (REKATAS et al., 2001). Nesse sentido, ressalta-se a importância de estudos tecnológicos associados a estudos biológicos conjuntos e comprobatórios da alteração favorável e significativa na resposta biológica ou terapêutica.

A griseofulvina (GF), metabólito produzido principalmente pelo *Penicillium griseofulvum*, é um fungistático utilizado, preferencialmente, contra dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (VLACHOU et al., 1992; GOINDI; AGGARWAL, 2006, 2012; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Também, pode ser utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e malignas, entretanto, esses usos são menos explorados (FINKELSTEIN; AMICHAÏ; GRUNWALD, 1996). GF, fármaco já considerado como de referência no tratamento de determinadas dermatomicoses, é capaz de gerar efeitos adversos associados à necessidade de longo período de tratamento por via oral, via na qual apresenta biodisponibilidade baixa e variável (ARIDA, AL-TABAKHA, HAMOURY, 2007; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Essa característica é típica de fármacos classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que apresentam baixa solubilidade, elevada permeabilidade e limitada biodisponibilidade (WU; BENET, 2004; FUJIOKA et al., 2007; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

Tendo em vista os aspectos acima abordados, GF exemplifica um caso típico de desafio para estudos de aumento de solubilidade, sendo amplamente utilizada como fármaco modelo para estes estudos (REKATAS et al., 2001; GOINDI; AGGARWAL, 2006; NOOMEN et al., 2008).

As dermatomicoses constam entre as infecções fúngicas mais comuns, atingindo cerca de 25% da população mundial (AMEEN, 2010; CORTEZ et al., 2012;

AGGARWAL; GOINDI, 2012; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013; TEKLEBIRHAN; BITEW, 2015). Mesmo com o advento de novos antifúngicos, observa-se uma prevalência crescente das dermatomicoses, acompanhada de elevação na resistência, nos efeitos adversos, na toxicidade e nas interações medicamentosas (STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; PERES et al., 2010). Esse quadro também incide na maior gravidade clínica, aumento de susceptibilidade por parte dos pacientes, propiciando o surgimento de infecções oportunistas. Ressalta-se, assim, a necessidade de estudos dirigidos para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, e livres dessas limitações, ou para a melhoria no desempenho dos antifúngicos já existentes, como GF (REKATAS et al., 2001; STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; GUPTA; COOPER, 2008; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; PERES et al., 2010; DIAS et al., 2013).

Neste panorama, a presente dissertação de mestrado tem por objetivo abordar a interação fármaco-polímero, possíveis alterações na solubilidade do fármaco e no efeito biológico de GF frente a isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

A presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos, em conformidade com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e encontra-se estruturada da seguinte forma:

– O **capítulo I** trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, abordando os aspectos relevantes para o desenvolvimento do trabalho: solubilidade; solubilização com uso de polímeros – dispersão sólida e solubilização micelar; aspectos referentes aos polímeros, em especial, os poloxâmeros; aspectos referentes ao antifúngico GF e aspectos referentes à atividade biológica – dermatomicoses, dermatófitos e tratamento;

– O **capítulo II** apresenta os resultados da validação de método analítico, por cromatografia líquida de alta eficiência, visando à quantificação de GF nas preparações contendo poloxâmero;

– O **capítulo III** apresenta os resultados obtidos nos estudos de solubilização de GF em preparações contendo poloxâmero 407, caracterização físico-química da possível interação fármaco-polímero e avaliação da atividade antifúngica, *in vitro*, de GF, na forma livre e associada ao P407, frente aos isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*—Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 437, p. 277–287, 2012.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 105, p. 158–166, 2013.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**. v. 28, p. 197–201, 2010.
- ARIDA, A. I.; AL-TABAKHA, M. M.; HAMOURY, H. A. J. Improving the High Variable Bioavailability of Griseofulvin by SEDDS. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 55, n. 12, p. 1713–1719, 2007.
- BATES, F. S. et al. Multiblock Polymers: Panacea or Pandora's Box? **Science**. v. 336, p. 434–440, 2012.
- BUCKLEY, S.T. et al. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, p. 8–16, 2013.
- CORTEZ, A. C. A. et al. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. **Revista Iberoamericana Micología**. v. 29, n. 4, p. 223–226, 2012.
- DIAS, M. F. R. G. et al. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 88, n. 6, p. 937–944, 2013.
- DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**. v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.
- FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 6, p. 189–194, 1996.
- FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 690 p. 2011.
- FUJIOKA, Y. et al. Prediction of oral absorption of griseofulvin, a BCS class II drug, based on GITA model: Utilization of a more suitable medium for *in-vitro* dissolution study. **Journal of Controlled Release**. v. 119, p. 222–228, 2007.
- GOINDI, S.; AGGARWAL, N. Preparation of hydrogels of griseofulvin for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 326, p. 20–24, 2006.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. **Mycopathologia**. v. 166, p. 353–367, 2008.

JINDAL, N.; MEHTA, S. K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 129, p. 100–106, 2015.

JONES, M. C.; LEROUX, J. C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 48, p. 101–111, 1999.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 420, p. 1–10, 2011.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutics Sciences**. v. 9, p. 304–316, 2014.

KUMAR, S. et al. Drug Carrier Systems for Solubility Enhancement of BCS Class II Drugs: A Critical Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 30, n. 3, p. 217–256, 2013.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 65, p. 259–269, 2007.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 453, p. 198–214, 2013.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A. ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**. v. 166, p. 369–383, 2008.

NOOMEN, A. et al. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs. **Materials Science and Engineering C**. v. 28, p. 705–715, 2008.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a Antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PIERRI, E.; AVGOUSTAKIS, K. Poly(lactide)-poly(ethylene glycol) micelles as a carrier for Griseofulvin. **Journal of Biomedical Materials Research A**. v. 75, p. 639–647, 2005.

REKATAS, C. J. et al. The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 3, p. 4769–4773, 2001.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5. ed. London: Pharmaceutical Press, 918 p. 2005.

STRATEN, M. R. V.; HOSSAIN, M. A.; GHANNOUM, M. A. Cutaneous infections Dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. **Infectious Disease Clinics North America**. v. 17, p. 87–112, 2003.

TAKAGI, T. et al. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular Pharmaceutics**. v. 3, n. 6, p. 631–643, 2006.

TEKLEBIRHAN, G.; BITEW, A. Prevalence of Dermatophytic Infection and the Spectrum of Dermatophytes in Patients Attending a Tertiary Hospital in Addis Ababa, Ethiopia. **International Journal of Microbiology**. p. 1–5, 2015.

TORCELLO-GÓMEZ, A. et al. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 206, p. 414–427, 2014.

VLACHOU, M. D. et al. Development and in vitro evaluation of griseofulvin gels using Franz diffusion cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 82, p. 47–52, 1992.

WU, C-Y; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**. v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a interação físico-química entre fármaco e polímero, avaliando *in vitro* a atividade de griseofulvina, isoladamente e associada ao polímero poloxâmero 407, sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a solubilidade do fármaco, utilizando diferentes concentrações de polímero;
2. Caracterizar a interação físico-química entre fármaco e polímero mediante calorimetria exploratória diferencial (DSC); espectroscopia de infravermelho com *Transformada de Fourier* (FT-IR); ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN); espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética;
3. Avaliar a susceptibilidade fúngica de isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* frente à griseofulvina, isoladamente e em mistura com o polímero selecionado;
4. Avaliar a possível correlação entre os dados físico-químicos e interação com a solubilidade e a atividade biológica.

CAPÍTULO I: Revisão da Literatura

Solubilidade

Solubilidade é uma propriedade físico-química, definida pela composição exata de uma solução saturada de um soluto em um determinado solvente, temperatura, pressão e pH, que está fortemente atrelada aos fenômenos de adsorção, miscibilidade, condutância, viscosidade, entre outros (HILDEBRAND et al., 1970; ADAMSKA; VOELKEL; HÉBERGER, 2007; FATHI-AZARBAYJANI et al., 2016). Conseqüentemente, também é um fenômeno de fundamental importância para a concepção de medicamentos, sobretudo daqueles preparados a base de fármacos pouco ou escassamente solúveis (SUBRAHMANYAM; PRAKASH; RAO, 1995; KAWABATA et al., 2011; FLORENCE; ATTWOOD, 2011; FATHI-AZARBAYJANI et al., 2016). A escassa solubilidade é reiteradamente o fator limitante, principalmente, para a dissolução *in vivo* do fármaco e, também, para sua absorção, levando a uma biodisponibilidade inadequada, com prejuízo do efeito terapêutico esperado (KAWABATA et al., 2011; BUCKLEY et al., 2013; KHADKA et al., 2014).

O advento da química combinatória e a automatização da síntese vêm contribuindo significativamente para o surgimento de novos candidatos a fármacos (LIPINSKI et al., 2001; BUCKLEY et al., 2013; KUMAR et al., 2013). Entretanto, grande parte das moléculas apresenta baixa solubilidade em água e, até mesmo, em solventes orgânicos (CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007; KAWABATA et al., 2011). Estimativas atuais indicam que, aproximadamente, 40% dos medicamentos comercializados e, em média, 80% das substâncias em processo de desenvolvimento correspondem a moléculas com baixa solubilidade aquosa (TAKAGI et al., 2006; KAWABATA et al., 2011; KHADKA et al., 2014; KALEPU; NEKKANTI, 2015).

Quando analisados esses dados à luz do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), fica evidente a importância do conhecimento e da compreensão das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas dos fármacos. Principalmente, no que tange a solubilidade e absorção, no processo de desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (AMIDON et al., 1995; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013; KHADKA et al., 2014). O SCB classifica os fármacos em quatro diferentes grupos — classes I, II, III e IV —,

levando em consideração dois fatores importantes: dissolução e permeabilidade (AMIDON et al., 1995; KUMAR et al., 2013).

Substâncias pertencentes à classe I do SCB são caracterizadas por apresentar alta solubilidade aquosa e alta permeabilidade intestinal. Estes fármacos apresentam boa absorção, sendo esta limitada apenas pela dissolução e/ou esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995; WU; BENET, 2004; KAWABATA et al., 2011).

Os fármacos classificados como classe II possuem como características baixa solubilidade e elevada permeabilidade (AMIDON et al., 1995; KAWABATA et al., 2011). Geralmente, a biodisponibilidade desses fármacos é limitada pela sua taxa de dissolução, de modo que mesmo um pequeno aumento na taxa de dissolução, por vezes, resulta em um grande aumento na biodisponibilidade (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; KAWABATA et al., 2011). Assim, espera-se que fatores associados à formulação como, por exemplo, aumento na solubilidade de saturação, demonstrem efeito positivo sobre a taxa de dissolução e absorção *in vivo* (KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

A classe III é constituída pelos fármacos que apresentam elevada solubilidade e baixa permeabilidade, sendo a biodisponibilidade limitada por esta última (AMIDON et al., 1995; KAWABATA et al., 2011). Assim, são necessárias estratégias que visem aumento de permeabilidade, por exemplo, através da utilização de promotores de absorção (BLUME; SCHUG, 1999; KAWABATA et al., 2011).

O último grupo, classe IV, é formado por fármacos com baixa solubilidade e baixa permeabilidade, propriedades críticas, tendo-se em vista que os dois fatores são limitantes para absorção (AMIDON et al., 1995; KAWABATA et al., 2011). Os medicamentos dessa classe podem apresentar grande variabilidade, em termos de absorção, tanto para o mesmo indivíduo, quanto para indivíduos diferentes, representando um desafio no momento de desenvolvimento e concepção da formulação (COOK; ADDICKS; WU, 2008; KAWABATA et al., 2011).

A eficácia clínica de um fármaco não depende apenas de sua atividade farmacológica intrínseca, mas também, deve ser formulado e atingir o sítio alvo de forma adequada (LU; PARK, 2013; FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Nesse sentido, a importância de tecnologias que viabilizem a preparação de medicamentos mais eficazes, assim como de novas estratégias de formulação, com o intuito de aumentar

a solubilidade de fármacos pouco solúveis, merecem destaque (REKATAS et al., 2001; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013; KALEPU; NEKKANTI, 2015).

Basicamente, os métodos de solubilização incluem três abordagens, que são modificações físicas, as modificações químicas e as modificações mediante uso de adjuvantes farmacêuticos (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; KALEPU; NEKKANTI, 2015). As modificações físicas compreendem redução de tamanho de partícula por micro- e nanonização, alteração do hábito cristalino e inclusão em dispersões sólidas (KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013). Por outro lado, as modificações químicas contemplam, por exemplo, mudança de pH, formação de sal e de pró-fármacos (KAWABATA et al., 2011; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). As modificações através do uso de adjuvantes incluem o emprego destes como solubilizantes, formadores de complexos de inclusão e sistemas carreadores como lipossomas, micelas e polímeros anfifílicos (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; KUMAR et al., 2013).

Entre as estratégias descritas, a utilização de polímeros destaca-se, sobretudo, pela inovação e desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas (REKATAS et al., 2001; LU; PARK, 2013). Os polímeros, principalmente aqueles que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, capazes de lhes conferir características anfifílicas, possibilitam a formulação de fármacos pouco solúveis em meios hidrofílicos (REKATAS et al., 2001; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007; CHIAPPETTA et al., 2011). Há um considerável número de trabalhos na literatura que abordam essa estratégia baseada na interação fármaco-polímero, ressaltando-se os métodos de dispersão sólida e solubilização micelar (LEUNER; DRESSMAN, 2000; REKATAS et al., 2001; KAWABATA et al., 2011; KALEPU; NEKKANTI, 2015).

Solubilização com polímero - Dispersão sólida

As dispersões sólidas podem ser definidas como sistemas heterogêneos que incluem uma ou mais substâncias ativas (soluto) no seio de uma matriz sólida hidrofílica (solvente), às vezes de natureza polimérica, e que tem revelado expectativas potenciais na concepção de formas farmacêuticas (CHIOU; RIEGELMAN, 1971; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009). Ainda que algumas formulações sejam constituídas por misturas de polímeros ou incluam outros componentes, como tensoativos, as dispersões sólidas são caracterizadas,

primordialmente, pela interação fármaco-polímero (CHIOU; RIEGELMAN, 1971; HUANG; DAI, 2014). Nesse sentido, a interação fármaco-polímero, bem como sua compreensão, são de fundamental importância para a concepção, estabilidade e desempenho da dispersão (LIN; HUANG, 2010; HUANG; DAI, 2014). De forma ideal, espera-se que o fármaco esteja molecularmente disperso no interior da matriz polimérica, formando uma dispersão homogênea e termodinamicamente estável, o que propicia uma maior superfície de contato, dissolução mais rápida e uma absorção mais eficiente (BIKIARIS et al., 2005; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; AJAZUDDIN et al., 2012; HUANG; DAI, 2014).

Nesse tipo de formulação, a dissolução do fármaco pode ser favorecida por diversos fatores, como método empregado, proporção e características do carreador, pH e temperatura do meio (ÖZKAN et al., 2000; ALVES et al., 2012). Contudo, entre os fatores citados, propriedades físico-químicas do carreador e do fármaco, interação fármaco-carreador e o método de obtenção das formulações apresentam-se mais relevantes para a determinação das propriedades das dispersões sólidas (JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; ALVES et al., 2012).

A seleção do carreador a ser utilizado deve ser criteriosa, considerando-se inatividade e segurança do polímero, solubilidade em meio aquoso e orgânico, presença de grupos funcionais, estabilidade térmica e termoplasticidade (MARSAC; SHAMBLIM; TAYLOR, 2006; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; ALVES et al., 2012). Os carreadores poliméricos mais utilizados podem ser de origem sintética, como polivinilpirrolidona e polietilenoglicol, ou natural, como hipromelose, etilcelulose e hidroxipropilcelulose (JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). De inserção mais recente no mercado, os poloxâmeros são polímeros amplamente utilizados na formulação de dispersões sólidas, além de serem solubilizantes, molhantes e estabilizadores de suspensões de uso frequente (SHAH et al., 2007; ALVES et al., 2012).

As formulações podem ser obtidas através de distintos métodos tecnológicos, entre esses, método de fusão, método de solvente, método de fusão-solvente, secagem por aspersão (*spray drying*) e fluido supercrítico (BIKIARIS et al., 2005; MARSAC; SHAMBLIM; TAYLOR, 2006; ALVES et al., 2012; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). No método de fusão, polímero e fármaco são aquecidos a temperatura acima do seu ponto de fusão, misturados e submetidos ao arrefecimento (SEKIGUCHI; OBI, 1961; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). O

método de solvente consiste na solubilização de fármaco e polímero em solvente orgânico comum, seguido da remoção do líquido (TACHIBANA; NAKAMURA, 1965; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). Já o método fusão-solvente corresponde a uma junção dos métodos anteriores (FERNANDEZ et al., 1992; ALVES et al., 2012). A atomização por *spray drying* vem sendo recentemente utilizada e possui os mesmos princípios do método de solvente, contudo é vantajosa pela aplicabilidade a materiais termolábeis (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; ALVES et al., 2012). Por fim, o método de fluido supercrítico ainda é uma técnica experimental, que vem emergindo como alternativa ao método de solvente (ALVES et al., 2012).

Solubilização com polímero - Solubilização micelar e micelas poliméricas

Uma das mais importantes aplicações dos sistemas micelares tem por intuito aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis e, também, a absorção e biodisponibilidade dessas, reduzindo o tempo de eliminação (RANGEL-YAGUI et al., 2005; REN et al., 2015). Comparadas a outras formas de veiculação, as micelas são obtidas de forma fácil e reprodutível em larga escala. Além disso, algumas preparações fluidas contendo sistemas micelares podem ser esterilizadas, garantindo, assim, a segurança para a administração (RANGEL-YAGUI et al., 2005; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014).

Micelas poliméricas são formadas por autoassociação de polímeros anfifílicos e diminuem a tensão superficial do meio aquoso (LU; PARK, 2013). Como resultado da sua natureza anfifílica, as moléculas de polímeros se estruturam de forma espontânea mediante interações hidrofóbicas, estéricas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e de van der Waals (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001; RANGEL-YAGUI et al., 2005). Em meio aquoso, as moléculas se orientam de modo ao sistema atingir a condição termodinâmica mais favorável. Assim a porção hidrofílica da molécula passa a ocupar os domínios externos do agregado, maximizando a interação com a água. Enquanto isso, a porção hidrofóbica determina um domínio interno, lipofílico e mais denso (RANGEL-YAGUI et al., 2005; LU; PARK, 2013).

Por ser hidrofóbico, o domínio interno possibilita a incorporação de substâncias com baixa solubilidade aquosa, dependendo da afinidade entre o domínio interno e a molécula hóspede, sobretudo em termos de parâmetros de

solubilidade (RANGEL-YAGUI et al., 2005; LU; PARK, 2013). Acredita-se que a formação das estruturas micelares e encapsulamento da molécula dentro do núcleo ocorra, principalmente, através de interações hidrofóbicas, que reduzem a energia livre do sistema, removendo os segmentos hidrofóbicos do ambiente aquoso (NAGARAJAN; BARRY; RUCKENSTEIN, 1986; LU; PARK, 2013).

Também, os fármacos podem se localizar no domínio externo, e não somente no interno (RANGEL-YAGUI et al., 2005). Espera-se que as substâncias mais hidrofílicas estejam adsorvidas na superfície da micela, enquanto as substâncias com polaridade intermediária sejam encontradas na zona de transição superfície-núcleo, que pode ser classificada como camada de hidratação. Por fim, espera-se que os fármacos hidrofóbicos, praticamente ou completamente insolúveis, estejam localizados no interior da micela, o núcleo (TORCHILIN, 2001; RANGEL-YAGUI et al., 2005).

A dinâmica da autoassociação na forma de micelas poliméricas inicia com uma concentração mínima de polímero, denominada concentração micelar crítica (CMC), a partir da qual as moléculas anfífilas deixam de existir separadamente e passam a coexistir, em equilíbrio, com as micelas (LU; PARK, 2013). A CMC é uma propriedade intrínseca de cada polímero anfílico, determinada pelo balanço entre a hidrofobia e a hidrofilia dos respectivos domínios da molécula. Em sistemas mais complexos, esse valor também depende de outros fatores, como pH, presença de eletrólitos e de outros solutos (RANGEL-YAGUI et al., 2005; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014). Em sistemas simples (polímero-meio dispersante) o intervalo de valores da CMC pode ser detectado pela variação brusca de determinadas propriedades físico-químicas da solução frente à concentração de polímero, entre outras, tensão superficial, condutividade elétrica, difração da luz, pressão osmótica e viscosidade (JONES; CHAPMAN, 1995; RANGEL-YAGUI et al., 2005).

Micelas, formadas pela associação não covalente dos monômeros de polímeros, são estruturas efêmeras e polimórficas, ocorrendo na forma esférica, cilíndrica, lamelar ou formas híbridas dessas, e, conseqüentemente, em diferentes tamanhos, desde nano- até micrométricos (LAWRENCE, 1994; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014). Normalmente, as micelas apresentam tamanhos que variam entre 5 e 100 nm, contudo, para utilização de micelas na área farmacêutica, o tamanho entre 10 e 80 nm é mais usual (JONES; CHAPMAN, 1995; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014; KHADKA et al., 2014).

Visando especificamente a aplicação dos sistemas micelares poliméricos como carreadores de fármacos, alguns autores postularam que a camada hidrofílica desses deve ser biologicamente inerte e prolongar o tempo de circulação sanguínea das micelas, prevenindo sua absorção não específica (QIU, 2007; LU; PARK, 2013). De modo mais amplo, KABANOV e ALAKHOV (2002) preconizam que o sistema micelar ideal para veiculação de fármacos deve se formar espontaneamente, apresentar tamanho aproximado de 10 nm, liberar a substância quando em contato com o alvo, ser estável, *in vivo*, durante período de tempo suficiente, e seus constituintes devem ser eliminados do organismo facilmente, após conclusão da função terapêutica. Com essas particularidades, presume-se que as estruturas permitirão a penetração em vários tecidos e até mesmo células, sem causar reações biológicas indesejadas (QIU, 2007; LU; PARK, 2013).

Nesse contexto, os poloxâmeros surgem como um dos grupos de polímeros mais amplamente utilizados com solubilizantes e carreadores. Poloxâmeros são copolímeros constituídos por unidades monoméricas óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente (KABANOV; ALAKHOV, 2002). Estes copolímeros anfifílicos, com comprimento da porção hidrofílica excedendo o comprimento da porção hidrofóbica, podem formar micelas esféricas em solução aquosa (ALEXANDRIDIS; OLSSON; LINDMAN, 1998). Além de reconhecidos oficialmente pelas principais farmacopeias internacionais (USP, 2013), destaca-se a propriedade de o domínio externo (formado por unidades OE) impedir o reconhecimento pelos macrófagos do sistema reticulo-endotelial, permitindo, assim, a circulação das micelas e entrega do fármaco de forma mais eficaz (LU; PARK, 2013).

Polímeros – Poloxâmeros

Os poloxâmeros são copolímeros tribloco, formados por sequências de monômeros ligados covalentemente, compostos de unidades óxido de etileno (OE) e óxido propileno (OP) dispostas em uma estrutura $OE_x-OP_y-OE_x$ (JONES; LEROUX, 1999; DUMORTIER et al., 2006; BATES et al., 2012; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014). Essa estrutura caracteriza sua identidade anfifílica, bem como define seu tamanho, valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo e CMC (KABANOV; ALAKHOV, 2002).

Também, devido a sua estrutura, os poloxâmeros podem se autoassociar em solução aquosa, originando micelas, com um domínio hidrofóbico (OP) e outro hidrofílico (OE) (LIN; ALEXANDRIDIS, 2002). Apesar dos diversos estudos referentes à micelização de poloxâmeros, não há consenso quanto aos valores de CMC, sendo que estes podem variar de 0,0005% a 1% (em massa) (JONES; LEROUX, 1999; KABANOV; ALAKHOV, 2002). Embora a CMC seja, usualmente, definida como um valor único de concentração, esta pode ocorrer em um intervalo relativamente amplo, principalmente por ser dependente de importantes fatores, como estrutura do polímero e temperatura (PRUD'HOMME; WU; SCHNEIDER, 1996; GUO et al., 2001). Alterações na estrutura decorrentes de um aumento do comprimento do bloco hidrofóbico e consequente elevação na hidrofobicidade favorecem a organização das unidades OP, resultando em diminuição da CMC. Em oposição, um aumento do comprimento do bloco hidrofílico e diminuição da hidrofobicidade resultam em desestabilização da estrutura micelar, elevando o valor de CMC (LETCHFORD; BURT, 2007). A temperatura do sistema, por sua vez, pode provocar alterações significativas mesmo com pequenas variações, sendo que aumento de temperatura acarreta em diminuição da CMC (ALEXANDRIDIS et al., 1994; KABANOV; ALAKHOV, 2002).

A autoassociação dos poloxâmeros pode resultar em distintas estruturas morfológicas ou mesofases, tais como esféricas, cúbicas, hexagonais e lamelares (RASPAUD et al., 1994; MORTENSEN, 2001). Em soluções relativamente diluídas do copolímero, espera-se que existam sob a forma de monômeros ou micelas, comumente retratadas como esferas compostas por um núcleo OP e uma superfície OE. No entanto, morfologias micelares adicionais também são relatadas (PRUD'HOMME; WU; SCHNEIDER, 1996). A formação das diferentes estruturas é influenciada pelo comprimento dos blocos hidrofílico e hidrofóbico, da concentração de copolímero e da temperatura, que podem provocar a transição entre as mesofases (MORTENSEN; PEDERSEN, 1993; RASPAUD et al., 1994; MORTENSEN, 2001). Destaca-se que a capacidade de solubilização dessas estruturas é diferenciada, sendo um fator importante a ser considerado na concepção das formulações (NAGARAJAN, 1999; KABANOV, ALAKHOV, 2002).

Nesse sentido, também cabe ressaltar, que a presença de um terceiro componente no sistema como, por exemplo, fármacos, pode afetar a morfologia dos agregados, interferindo em aspectos como tamanho, número de agregação e

parâmetros essenciais para liberação do soluto. IVANOVA e colaboradores (2000a, 2000b) têm estudado essas possíveis interferências e demonstraram que o aparecimento das mesofases pode mostrar-se distinto na presença de outros compostos, como solventes orgânicos ou óleo. Em geral, as micelas esféricas formadas por poloxâmeros apresentam diâmetro médio entre 20 e 80 nm, encaixando-se no intervalo considerado adequado para as micelas de veiculação farmacêutica (IVANOVA, LINDMAN, ALEXANDRIDIS, 2000a, 2000b; CHIAPPETTA et al., 2011).

Os distintos tipos de poloxâmeros são caracterizados por variações quanto ao número e/ou proporção dos monômeros, diferindo em tamanho e caráter hidrofílico ou lipofílico (KABANOV; ALAKHOV, 2002). A nomenclatura dos poloxâmeros fornece informações sobre as características inerentes a cada tipo, tendo-se em vista que são definidos por um código numérico relacionado a parâmetros estruturais de peso molecular do bloco OP e proporção do bloco OE. Poloxâmero 407 (P407) (figura 1) apresenta peso molecular médio de 12.600 Da (9.840 – 14.600), proporção de unidades OE e OP entre 95-105 e 54-65, respectivamente, e valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo entre 18-23 (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2005; DUMORTIER et al., 2006). É reconhecido pelos órgãos regulamentadores, tais como o FDA (Food and Drugs Administration), como um excipiente adequado para as diferentes formas farmacêuticas (JINDAL; MEHTA, 2015). E, atualmente, um número considerável de patentes associadas ao P407 está registrado, sendo que diferentes tipos de formulações, como oftálmicas, tópicas, orais e injetáveis foram desenvolvidas (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2005; DUMORTIER et al., 2006; JINDAL; MEHTA, 2015).

O potencial uso de P407 na solubilização de fármacos com limitada solubilidade vem sendo amplamente investigada (REKATAS et al., 2001; LEE et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2011). Este, através de suas características, mostrou promover a solubilização de fármacos pouco solúveis como o felodipino, que teve sua solubilidade consideravelmente aumentada na presença de polímero (LEE et al., 2008). Dessa forma, P407 representa uma ferramenta muito útil para contornar problemas de solubilidade como, por exemplo, da griseofulvina, e para a concepção e produção de formulações farmacêuticas.

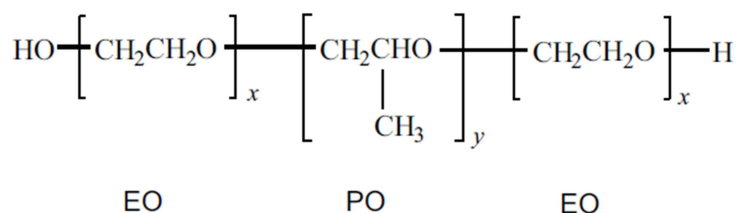


Figura 1. Estrutura química geral dos poloxâmeros (P407 = OE₁₀₅-OP₆₅-OE₁₀₅)

Griseofulvina

Griseofulvina (figura 2), agente antifúngico com propriedade fungistática, caracteriza-se por ser um metabólito produzido, principalmente, pelo *Penicillium griseofulvum* (VLACHOU et al., 1992; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). É utilizado para o tratamento de dermatomicoses, sendo efetivo, preferencialmente, contra dermatófitos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Porém, também pode ser utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e malignas, contudo esses usos são menos explorados (FINKELSTEIN; AMICHAÏ; GRUNWALD, 1996; GOINDI; AGGARWAL, 2006, 2012; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013).

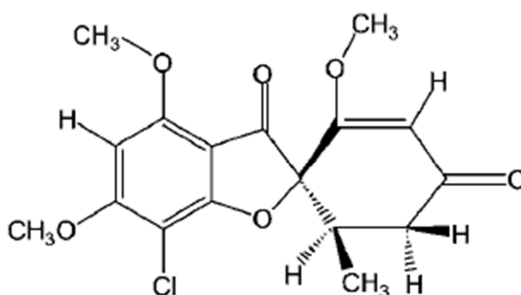


Figura 2. Estrutura química de GF (Adaptado de Rekatas et al., 2001)

Após administração via oral, GF difunde-se e deposita-se, principalmente, nas células precursoras de queratina, exercendo sua atividade terapêutica (ZOMORODIAN et al., 2007; AGGARWAL; GOINDI, 2012). Tem por mecanismo de ação a inibição da mitose através da perturbação do fuso mitótico pela interação com os microtúbulos polimerizados, inibindo, assim, a síntese de ácidos nucleicos e impedindo a divisão na metáfase (GULL; TRINCI, 1973; FINKESLSTEIN et al., 1996;

AGGARWAL; GOINDI, 2012). Sabe-se que afeta igualmente as subunidades α e β da tubulina, provocando mudanças em sua conformação, contudo seus efeitos precisos ainda não foram totalmente esclarecidos (ZOMORODIAN et al., 2007).

Apesar de já ter sido fármaco referência na terapêutica de determinadas dermatomicoses, requer um longo período de tratamento por via oral e está associado com uma baixa e variável biodisponibilidade e diversos efeitos adversos (VLACHOU et al., 1992; ARIDA, AL-TABAKHA, HAMOURY, 2007; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). GF, classificada como fármaco classe II da SCB, apresenta baixa solubilidade, elevada permeabilidade e, conseqüentemente, limitada biodisponibilidade (KAWABATA et al., 2011; FUJIOKA et al., 2007; KUMAR et al., 2013).

Estes aspectos tornam GF um exemplo típico de desafio para estudos de aumento de solubilidade, com intuito de melhorar sua atividade e possibilitar um tratamento mais eficaz. Também, suscitam o desenvolvimento de novas formulações como, por exemplo, a de administração via tópica, uma vez que contornaria os problemas de uso oral (ALY et al., 1994; GOINDI; AGGARWAL, 2006; NOOMEN et al., 2008). Diversos autores estudam o potencial uso de polímeros, tais como os poloxâmeros, na solubilização de fármacos pouco solúveis, incluindo GF, e demonstraram resultados interessantes quanto à combinação GF-polímero (REKATAS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2011).

Dermatomicoses e Dermatofitos

As infecções fúngicas representam um problema de magnitude global, afetando, de forma grave, mais de 300 milhões de pessoas (PARKER et al., 2014; GAFFI, 2016). Algumas delas, como as micoses cutâneas ou dermatomicoses superficiais, podem incidir em até 25% da população mundial, demonstrando contínuo aumento de incidência (AMEEN, 2010; CORTEZ et al., 2012; TEKLEBIRHAN; BITEW, 2015). Trata-se de infecções dos tecidos queratinizados — pele, unha, cabelo —, geralmente, causadas por dermatofitos, um grupo de fungos filamentosos hialinos e septados, relacionados taxonomicamente. Estes são capazes de invadir e infectar tecidos queratinizados, graças a suas propriedades queratinofílicas e queratolíticas (STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; DE DIEGO, 2011). Afetam tanto indivíduos saudáveis quanto vulneráveis, de forma e

gravidade variáveis, podendo ser meramente desagradáveis esteticamente ou causar morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos (JOHNSON, 2000; KATHIRAVAN et al., 2012). As lesões próprias dessa infecção de pele podem ser resultado da ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao patógeno e seus metabólitos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; PERES et al., 2010). Essas micoses são influenciadas por fatores predisponentes como: idade, comprometimento imunológico, contato com animais, alteração climática e condições socioeconômicas, variando de uma região para outra do mundo e podendo durar meses ou anos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; PERES et al., 2010; WOREK et al., 2014).

As espécies dermatofíticas podem ser divididas de acordo com os habitats em que estão inseridas primariamente em espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas, sendo que patógenos dos três nichos podem estar associados com doenças em humanos (DE DIEGO, 2011; CORTEZ et al., 2012). As espécies antropofílicas estão, habitualmente, vinculadas aos seres humanos, sendo responsáveis por cerca de 70% das dermatomicoses, e raramente a animais (PERES et al., 2010). Por sua vez, as espécies zoofílicas estão associadas a inúmeras espécies de animais, mas também representam aproximadamente 30% das dermatomicoses em humanos. As espécies geofílicas são encontradas no solo e estão associadas com material queratinoso em decomposição, causando, ocasionalmente, infecções em seres humanos e animais (STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; DE DIEGO, 2011).

Segundo as suas características morfológicas e fisiológicas os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (MUKHERJEE et al., 2003; WOREK et al., 2014). Entre os três gêneros anamórficos, *Trichophyton* é o mais comumente associado às infecções em humanos, sendo as espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* as mais frequentes (DE DIEGO, 2011; WOREK et al., 2014). *Trichophyton rubrum* pode ser apontado como agente causador de cerca de 70% das infecções por dermatófitos, entre elas *Tinea unguium* e *Tinea pedis* (MUKHERJEE et al., 2003). Os membros pertencentes ao conjunto de espécies de *Trichophyton mentagrophytes* também são agentes corriqueiros de infecções em humanos, causando *Tinea corporis*, *Tinea capitis*, *Tinea pedis* e *Tinea unguium* (MUKHERJEE et al., 2003; SYMOENS et al., 2011).

Tratamento

A cura espontânea de dermatomicoses é bastante rara. O tratamento baseia-se na utilização de medicamentos fungicidas ou fungistáticos, sozinhos ou em combinação. Os tratamentos costumam ser longos e onerosos, cuja resposta terapêutica depende da resistência das espécies, local afetado e estado imunológico do hospedeiro (STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; PERES et al., 2010; DE DIEGO, 2011).

Nos casos mais graves e persistentes de infecções ou em caso de não ocorrer resposta ao tratamento tópico, a terapia com agentes sistêmicos é mais indicada. No entanto, esta é acompanhada de efeitos adversos desagradáveis (CHANG et al., 2007; HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Já nos casos em que as dermatomicoses apresentam resposta limitada ou ausente ao tratamento oral e, também, nos casos em que as reações adversas se sobressaem, a utilização de antifúngicos de uso tópico surge como terapia alternativa ou de apoio à sistêmica (JOHNSON, 2000; HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008).

Diversos agentes antifúngicos foram descobertos nos últimos anos e, mesmo com a contribuição destes, ainda há limitações consideráveis quanto à relação custo-benefício, efeitos adversos, toxicidade e interações medicamentosas (PERES et al., 2010; MILLIKAN, 2010; DIAS et al., 2013). Apesar da disponibilidade de tratamentos tópicos e sistêmicos, tem se observado um aumento da incidência de algumas dermatomicoses, provavelmente relacionado com infecções fúngicas mais graves ou difíceis de tratar, com doenças simultâneas, aumento de susceptibilidade por parte dos pacientes e desenvolvimento de resistência (STRATEN; HOSSAIN; GHANNOUM, 2003; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; PERES et al., 2010). Nesse contexto, reitera-se a necessidade de estudos para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e livres dessas limitações, ou para a melhoria no desempenho dos antifúngicos já existentes (GUPTA; COOPER, 2008; PERES et al., 2010; DIAS et al., 2013).

GF, atualmente, não é o antifúngico de primeira escolha no tratamento de algumas dermatomicoses, entretanto continua sendo uma opção terapêutica importante, além de servir como fármaco de referência em diversos estudos. E, considerando também a crescente resistência de diversos dermatófitos aos atuais

antifúngicos de escolha, julgou-se procedente a investigação de GF como substância modelo na abordagem físico-química e biológica.

REFERÊNCIAS

ADAMSKA, K.; VOELKEL, A.; HÉBERGER, K. Selection of solubility parameters for characterization of pharmaceutical excipients. **Journal of Chromatography A**. v. 1171, p. 90–97, 2007.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*—Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 437, p. 277–287, 2012.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 105, p. 158–166, 2013.

AJAZUDDIN, R. T. et al. An Exhaustive Review on Solubility Enhancement for Hydrophobic Compounds by Possible Applications of Novel Techniques. **Trends in Applied Sciences Research**. v. 7, n. 8, p. 596–619, 2012.

ALEXANDRIDIS, P. et al. Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. **Langmuir**. v. 10, p. 2604–2612, 1994.

ALEXANDRIDIS, P.; OLSSON, U.; LINDMAN, B. A Record Nine Different Phases (Four Cubic, Two Hexagonal, and One Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline and Two Micellar Solutions) in a Ternary Isothermal System of an Amphiphilic Block Copolymer and Selective Solvents (Water and Oil). **Langmuir**. v. 14, p. 2627–2638, 1998.

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

ALY, R. et al. Topical griseofulvin in the treatment of dermatophytoses. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 46, p. 43–46, 1994.

AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**. v. 28, p. 197–201, 2010.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**. v. 12, p. 413–420, 1995.

ARIDA, A. I.; AL-TABAKHA, M. M.; HAMOURY, H. A. J. Improving the High Variable Bioavailability of Griseofulvin by SEDDS. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 55, n. 12, p. 1713–1719, 2007.

BATES, F. S. et al. Multiblock Polymers: Panacea or Pandora's Box? **Science**. v. 336, p. 434–440, 2012.

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

BLUME, H. H.; SCHUG, B. S. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs — better candidates for BA/BE waiver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 9, p. 117–121, 1999.

BUCKLEY, S.T. et al. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, p. 8–16, 2013.

CHANG, C-H. et al. The Safety of Oral Antifungal Treatments for Superficial Dermatophytosis and Onychomycosis: A Meta-analysis. **The American Journal of Medicine**. v. 120, p. 791–798, 2007.

CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 66, p. 303–317, 2007.

CHIAPPETTA, D. A. et al. Synergistic encapsulation of the anti-HIV agent efavirenz within mixed poloxamine/poloxamer polymeric micelles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 7, p. 624–637, 2011.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60, p. 1281–1302, 1971.

COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y. H. Application of the Biopharmaceutical Classification System in Clinical Drug Development—An Industrial View. **The AAPS Journal**. v. 10, n. 2, p. 306–310, 2008.

CORTEZ, A. C. A. et al. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. **Revista Iberoamericana Micología**. v. 29, n. 4, p. 223–226, 2012.

DE DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 29, n. 3, p. 33–39, 2011.

DIAS, M. F. R. G. et al. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 88, n. 6, p. 937–944, 2013.

DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**. v. 23, n. 12, 2709–2728, 2006.

FATHI-AZARBAYJANI, A. et al. Measurement and correlation of deferiprone solubility: Investigation of solubility parameter and application of van't Hoff equation

and Jouyban–Acree model. **Journal of Molecular Liquids**. v. 215, p. 339–344, 2016.

FERNANDÉZ, M. et al. Characterization of solid dispersions of piroxicam/polyethyleneglycol 4000. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 84, p. 197–202, 1992.

FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 6, p. 189–194, 1996.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 690 p. 2011.

FUJIOKA, Y. et al. Prediction of oral absorption of griseofulvin, a BCS class II drug, based on GITA model: Utilization of a more suitable medium for *in-vitro* dissolution study. **Journal of Controlled Release**. v. 119, p. 222–228, 2007.

GOINDI, S.; AGGARWAL, N. Preparation of hydrogels of griseofulvin for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 326, p. 20–24, 2006.

GULL, K.; TRINCI, A. P. J. Griseofulvin inhibits fungal mitosis. **Nature**. v. 244, p. 292–294, 1973.

GUO, L. et al. Micellar structure changes in aqueous mixtures of nonionic surfactants. **Journal of Rheology**. v. 45, n.5, p. 1223–1243, 2001.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. **Mycopathologia**. v. 166, p. 353–367, 2008.

HAVLICKOVA, B.; CZAIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**.v. 51, n. 4, p. 2–15, 2008.

HILDEBRAND, J. H.; PRAUSNITZ, J. M.; SCOTT, R. L. **Regular and related solutions: the solubility of gases, liquids, and solids**. New York: Van Nostrand Reinhold Co. 228 p. 1970.

HUANG, Y.; DAI, W-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014.

IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 1. Phase Diagrams and Structure Identification. **Langmuir**. v. 16, p. 3660–3675, 2000a.

IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Evolution in Structural Polymorphism of Pluronic F127 Poly(ethyleneoxide)-Poly(propyleneoxide) Block Copolymer in Ternary Systems with Water and Pharmaceutically Acceptable Organic Solvents: From “Glycols” to “Oils”. **Langmuir**. v. 16, p. 9058–9069, 2000b.

JANSSENS, S.; VAN DEN MOOTER, G. Review: physical chemistry of solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 61, p. 1571–1586, 2009.

JINDAL, N.; MEHTA, S. K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 129, p. 100–106, 2015.

JOHNSON, R. A. Dermatophyte infections in human immune deficiency virus (HIV) disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 43, p. 135–142, 2000.

JONES, M. N.; CHAPMAN, D. **Micelles, monolayers and biomembranes**. New York: Wiley-Liss, 252 p. 1995.

JONES, M. C.; LEROUX, J. C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 48, p. 101–111, 1999.

KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 19, n. 1, p. 1–73, 2002.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 47, p. 113–131, 2001.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 5678–5698, 2012.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 420, p. 1–10, 2011.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutics Sciences**. v. 9, p. 304–316, 2014.

KUMAR, S. et al. Drug Carrier Systems for Solubility Enhancement of BCS Class II Drugs: A Critical Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 30, n. 3, p. 217–256, 2013.

LAWRENCE, M. J. Surfactant Systems: Their Use in Drug Delivery. **Chemical Society Reviews**. p. 417–424, 1994.

LEE, K-R. et al. Effect of Poloxamer on the Dissolution of Felodipine and Preparation of Controlled Release Matrix Tablets Containing Felodipine. **Archives of Pharmacal Research**. v. 3, n. 8, p. 1023–1028, 2008.

LETCHEFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 65, p. 259–269, 2007.

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

LIN, Y.; ALEXANDRIDIS, P. Temperature-Dependent Adsorption of Pluronic F127 Block Copolymers onto Carbon Black Particles Dispersed in Aqueous Media. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 106, p. 10834–10844, 2002.

LIN, D.; HUANG, Y. A thermal analysis method to predict the complete phase diagram of drug–polymer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 399, p. 109–115, 2010.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 46, p. 3–26, 2001.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, p. 3–12, 2000.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 453, p. 198–214, 2013.

MARSAC, P. J.; SHAMBLIN, S. L.; TAYLOR, L. N. Theoretical and Practical Approaches for Prediction of Drug–Polymer Miscibility and Solubility. **Pharmaceutical Research**. v. 23, n. 10, p. 2417–2426, 2006.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A. ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**. v. 166, p. 369–383, 2008.

MILLIKAN, L. E. Current concepts in systemic and topical therapy for superficial mycoses. **Clinics in Dermatology**. v. 28, p. 212–216, 2010.

MORTENSEN, K. et al. Structural Properties of Self-assembled Polymeric Aggregates in Aqueous Solutions. **Polymers For Advanced Technologies**. v. 12, p. 2–22, 2001.

MORTENSEN, K.; PERDERSEN, J. S. Structural Study on the Micelle Formation of Poly(ethyleneoxide)-Poly(propyleneoxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Aqueous Solution. **Macromolecules**. v. 26, p. 805–812, 1993.

MUKHERJEE, P. K. et al. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 1, p. 82–86, 2003.

NAGARAJAN, R.; BARRY, M.; RUCKENSTEIN, E. Unusual Selectivity in Solubilization by Block Copolymer Micelles. **Langmuir**. v.2, n. 2, p. 210–215, 1986.

NAGARAJAN, R. Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic (PEO-PPO-PEO) block copolymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 16, p. 16–55, 1999.

NOOMEN, A. et al. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs. **Materials Science and Engineering C**. v. 28, p. 705–715, 2008.

OLIVEIRA, C. P. et al. The effect of water-soluble polymers, PEG and PVP, on the solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of Pluronic F127. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 421, p. 252–257, 2011.

ÖZKAN, Y. et al. Enhanced release of solid dispersions of todolac in polyethylene glycol. **Il Farmaco**. v. 55, p. 433–438, 2000.

PARKER, J. E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Biological Chemistry**. v. 7, p. 143–161, 2014.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a Antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

PIERRI, E.; AVGOUSTAKIS, K. Poly(lactide)-poly(ethylene glycol) micelles as a carrier for Griseofulvin. **Journal of Biomedical Materials Research A**. v. 75, p. 639–647, 2005.

PRUD'HOMME, R. K; WU, G.; SCHNEIDER, D. K. Structure and Rheology Studies of Poly(oxyethylene-oxypropylene-oxyethylene) Aqueous Solution. **Langmuir**. v. 12, p. 4651–4659, 1996.

QIU, L. et al. Polymeric micelles as nanocarriers for drug delivery. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 17, n. 7, p. 819–830, 2007.

RANGEL-YAGUI, C. O. et al. Micellar solubilization of drugs. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 8, n. 2, p. 147–163, 2005.

RASPAUD, E.; LAIREZ, D.; ADAM, M.; CARTON, J. P. Triblock Copolymers in a Selective Solvent. 1. Aggregation Process in Dilute Solution. **Macromolecules**. v. 27, p. 2956–2964, 1994.

REKATAS, C. J. et al. The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 3, p. 4769–4773, 2001.

REN, J. et al. A micelle-like structure of poloxamer–methotrexate conjugates as nanocarrier for methotrexate delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 487, p. 177–186, 2015.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5. ed. London: Pharmaceutical Press, 918 p. 2005.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**. p. 1–10, 2012.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixtures. I.A. comparison of the behaviour of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 9, p. 866–872, 1961.

SHAH, T. J. et al. Process Optimization and Characterization of Poloxamer Solid Dispersions of a Poorly Water-soluble Drug. **AAPS Pharm Sci Tech**. v. 8, n. 2, p. 1–7, 2007.

STRATEN, M. R. V.; HOSSAIN, M. A.; GHANNOUM, M. A. Cutaneous infections Dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. **Infectious Disease Clinics North America**. v. 17, p. 87–112, 2003.

SYMOENS, F. et al. Molecular analysis and mating behaviour of the Trichophyton mentagrophytes species complex. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 301, p. 260–266, 2011.

SUBRAHMANYAM, C. V. S.; PRAKASH, R.; RAO, P. G. Estimation of the solubility parameter of trimethoprim by current methods. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**. v. 71, p. 175–183, 1996.

TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A methode for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: dispersion of β -carotene by polyvinylpyrrolidone, **Colloid and Polymer Science**. v. 203, n. 2, p. 130–133, 1965.

TAKAGI, T. et al. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular Pharmaceutics**. v. 3, n. 6, p. 631–643, 2006.

TEKLEBIRHAN, G.; BITEW, A. Prevalence of Dermatophytic Infection and the Spectrum of Dermatophytes in Patients Attending a Tertiary Hospital in Addis Ababa, Ethiopia. **International Journal of Microbiology**. p. 1–5, 2015.

TORCELLO-GÓMEZ, A. et al. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 206, p. 414–427, 2014.

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

USP, 2013. United States Pharmacopeia, 36th ed. U.S. Pharmacopeia, Rockville.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**. v. 12, p. 1068–1075, 2007.

VLACHOU, M. D. et al. Development and in vitro evaluation of griseofulvin gels using Franz diffusion cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 82, p. 47–52, 1992.

ZOMORODIAN, K. et al. The effect of griseofulvin on the gene regulation of β -tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 13, p. 373–379, 2007.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.

WOREK, M. et al. Identification of dermatophyte species using genomic in situ hybridization (GISH). **Journal of Microbiological Methods**. v. 100, p. 32–41, 2014.

WU, C-Y; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**. v. 22, n. 1, 11–23, 2005.

CAPÍTULO II: Desenvolvimento e validação de método analítico rápido por CLAE-PDA para quantificação de griseofulvina em estudos de solubilização com poloxâmeros

Desenvolvimento e validação de método analítico rápido por CLAE-PDA para quantificação de griseofulvina em estudos de solubilização com poloxâmeros

Vanessa Pittol¹, Samuel Kaiser¹, George González Ortega¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

Griseofulvina (GF) é um antifúngico fungistático utilizado para o tratamento de dermatomicoses, sendo efetivo contra dermatófitos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Sua via de administração convencional é a oral, contudo está associada com uma baixa e variável biodisponibilidade, resultante de sua limitada solubilidade e elevada permeabilidade. A utilização de polímeros, principalmente aqueles com características anfifílicas, vem destacando-se como estratégia para melhorar a solubilização de fármacos pouco solúveis. O poloxâmero 407 (P407), polímero composto por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), vem sendo amplamente estudado como agente solubilizante. Com o intuito de verificar possíveis alterações na solubilização de GF, através da interação com P407, tornou-se necessário o desenvolvimento e a validação de método para quantificação do fármaco solubilizado na presença do polímero. O método em fase reversa foi desenvolvido empregando-se coluna Phenomenex Kinetex[®] C18 100A (150 × 4,6 mm DI, 5 µm), fluxo de eluente de 1,1 mL/min de sistema isocrático composto por acetonitrila:água (35:65, v/v), acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. A temperatura de forno foi de 35 °C e o comprimento de onda da análise foi 290 nm. A metodologia desenvolvida mostrou-se específica, linear, precisa, exata e robusta para uma faixa de concentração de 0,25 – 15,0 µg/mL, visando a quantificação de GF na presença de polímero.

Palavras-chave: griseofulvina; polímero; poloxâmero; CLAE; validação.

Introdução

Griseofulvina (GF) (figura 1), metabólito produzido, principalmente, pelo *Penicillium griseofulvum*, é um antifúngico com propriedades fungistáticas (VLACHOU et al., 1992; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Tem como mecanismo de ação a inibição da mitose através da perturbação do fuso mitótico pela interação com os microtúbulos polimerizados (GULL; TRINCI, 1973; FINKELSTEIN; AMICHAÏ; GRUNWALD, 1996; ZOMORODIAN et al., 2007; AGGARWAL; GOINDI, 2012). GF é utilizada para o tratamento de dermatomicoses, sendo efetiva, preferencialmente, contra dermatófitos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Entretanto, também pode ser utilizada no tratamento de doenças inflamatórias e malignas, contudo esses usos são menos explorados (FINKELSTEIN; AMICHAÏ; GRUNWALD, 1996; GOINDI; AGGARWAL, 2006, 2012; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013).

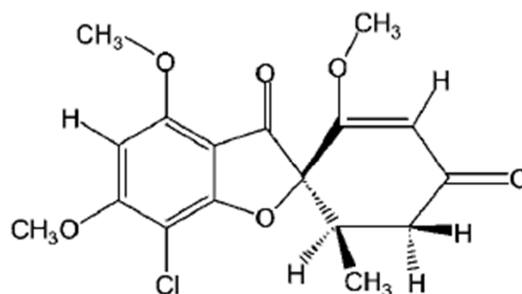


Figura 1. Estrutura química de GF (Adaptado de Rekatás et al., 2001).

Embora tenha sido fármaco referência na terapêutica de determinadas dermatomicoses, requer um longo período de tratamento por via oral e está associado com uma baixa e variável biodisponibilidade e diversos efeitos colaterais (VLACHOU et al., 1992; ARIDA, AL-TABAKHA, HAMOURY, 2007; AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Por pertencer à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), GF apresenta baixa solubilidade, elevada permeabilidade e, conseqüentemente, limitada biodisponibilidade (FUJIOKA et al., 2007; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013). Estes aspectos a tornam uma candidata potencial para estudos de aumento de solubilidade, com intuito de melhorar sua atividade e

possibilitar um tratamento mais eficaz e, também, para o desenvolvimento de novas formulações (ALY et al., 1994; GOINDI; AGGARWAL, 2006; NOOMEN et al., 2008).

Diversas estratégias de formulação, com o intuito de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, são estudadas e relatadas na literatura (REKATAS et al., 2001; KAWABATA et al., 2011; KUMAR et al., 2013; KALEPU; NEKKANTI, 2015). Nesse sentido, a utilização de polímeros, estratégia baseada na interação fármaco-polímero, vem destacando-se, principalmente, na inovação e no desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas (REKATAS et al., 2001; LU; PARK, 2013). Os polímeros, sobretudo aqueles que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, capazes de lhes conferir características anfífilas, possibilitam a formulação de fármacos escassamente solúveis em veículos hidrofílicos (REKATAS et al., 2001; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007; CHIAPPETTA et al., 2011). O poloxâmero 407 (P407), polímero composto por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), vem sendo amplamente estudado como agente promotor de solubilidade de diversos fármacos lipofílicos e, também, utilizado em diferentes tipos de formulações como, por exemplo, de uso oral, tópico e oftálmico (KABANOV; ALAKHOV, 2002; ROWE; SHESKEY; OWEN, 2005; DUMORTIER et al., 2006).

Com o intuito de verificar possíveis alterações na solubilização de GF, através da interação com P407, tornou-se necessário empregar um método analítico para quantificação de fármaco solubilizado na presença do polímero. Também, de acordo com dados encontrados na literatura, amostras de GF podem conter impurezas originadas em sua síntese ou degradação (KAHSAY et al., 2013). Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método analítico rápido e eficiente, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), visando à quantificação de GF e das suas principais impurezas, na presença de poloxâmero. O método foi validado de acordo com parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez.

Metodologia

Materiais

Griseofulvina (98% de pureza) foi adquirida de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e poloxâmero 407 foi, gentilmente, doado por BASF (Ludwigshafen am Rhein, Alemanha). Acetonitrila (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), ácido fórmico (Tedia, Fairfield, Estados Unidos) e água ultrapura obtida de sistema Milli-Q® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados como fase móvel nas análises por CLAE-PDA. Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE.

Equipamentos e condições analíticas

A metodologia para análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada em equipamento CLAE (Prominence, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com controlador de sistema FCV-AL 10, sistema de bomba LC-20 AT, injetor automático SIL-20 A e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A. Os dados obtidos foram processados por software LC-Solution Multi-PDA (Shimadzu, Tóquio, Japão). A fase estacionária foi coluna Phenomenex Kinetex® C18 100A (150 × 4,6 mm DI, 5 µm) acoplada à pré-coluna SecurityGuard ULTRA Phenomenex C18 (4,6 mm DI, sub-2 µm). O sistema utilizado foi isocrático, constituído por uma mistura de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água (A) e ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila (B) (65:35, v/v) como fase móvel, filtrada em membrana de 0,45 µm Millipore® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e desgaseificada por 30 minutos. O fluxo do eluente (1,1 mL/min), a temperatura (35 ± 1 °C) e o volume de injeção (20 µL) foram mantidos constantes durante todas as análises. A detecção foi realizada em 290 nm. Todas as amostras foram adequadamente diluídas na fase móvel e filtradas em membrana com poro de 0,45 µm Millipore® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Validação do método analítico

A validação do método foi realizada de acordo com guia oficial do ICH (ICH, 2001; ICH 2005), seguindo-se as características de linearidade, especificidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

Preparação das amostras

Foi preparada uma solução estoque de padrão de GF na concentração de 50 µg/mL, pesando-se 2,5 mg e diluindo-se em acetonitrila.

Para ensaio de recuperação, preparou-se amostra de fármaco com polímero, dissolvidos em água. A uma solução previamente preparada contendo 3% de P407 adicionou-se um excesso de fármaco, posteriormente agitada magneticamente por 24 h a 37 °C, centrifugada (3600 G) e filtrada (membrana 0,45 µm). A quantidade de GF solubilizada na amostra foi quantificada.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas de padrão de GF na presença de P407 em concentração de 3%, da solução do polímero P407 (3%) e do diluente.

Curva analítica

A curva analítica foi preparada a partir da solução estoque de padrão de GF e diluída com acetonitrila:água (35:65, v/v) acidificadas com ácido fórmico 0,1% (v/v). A curva foi preparada nas concentrações de: 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL. Cada ponto foi preparado e injetado em triplicata e em três dias diferentes. A relação entre área do pico de GF e concentração de analítico foi ajustada por análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados (software MINITAB® 16, Pensilvânia, Estados Unidos).

Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados através da curva analítica, utilizando-se os valores de desvio padrão do intercepto (ρ) e da inclinação (S) ($LOD = 3.3 \rho/S$ e $LOQ = 10 \rho/S$).

Precisão

A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) das análises de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada a partir da

análise de três determinações nas concentrações de 0,25; 5,0 e 15,0 µg/mL de GF com P407, no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada através das análises das soluções, em três dias consecutivos e sob as mesmas condições experimentais.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por análise de recuperação, após adição de padrão de GF em concentrações conhecidas (0,25; 5,0 e 10,0 µg/mL) à amostra contendo P407 e GF (28 µg/mL), e previamente diluída em balão volumétrico. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado da recuperação foi expresso em porcentagem, comparando-se com os valores obtidos nas mesmas concentrações de padrão, porém na ausência da matriz.

Robustez

A robustez foi determinada através da análise de amostra contendo GF na concentração de 10 µg/mL, na presença de polímero. Foram avaliados os parâmetros de fluxo de eluente (1,05 – 1,15 mL/min), proporção de fase móvel (quantidade de acetonitrila: 34,5 – 35,5%), temperatura de forno (33 – 37 °C) e comprimento de onda (289 – 291 nm). O efeito da variação desses parâmetros sobre a resposta (concentração de GF) foi avaliada por teste de F seguido de teste *t* de *Student*.

Resultados e Discussão

O método analítico validado apresentou menor tempo de corrida (10 min) em comparação com métodos encontrados na literatura (KAHSAY et al., 2013). A fase móvel mostrou-se adequada, proporcionando uma eficiência apropriada. Observaram-se picos com boa resolução ($R_s > 2,5$), número de pratos teóricos ($N > 10000$) e fator de cauda ($F_c = 1,07$) adequados.

Especificidade

A especificidade do método pode ser obtida através de comparação dos cromatogramas de soluções de mistura GF-P407, P407 e diluente (fase móvel) (figura 2). Assim, verificou-se que o método é seletivo e específico, não ocorrendo alteração do pico de GF na presença de P407 e do diluente, e, também, permite uma resolução cromatográfica adequada em relação às impurezas de síntese/degradação presentes no material de partida (KAHSAY et al., 2013). A pureza do pico foi avaliada por detector de arranjo de fotiodo (DAD), sendo a pureza superior a 0,9999.

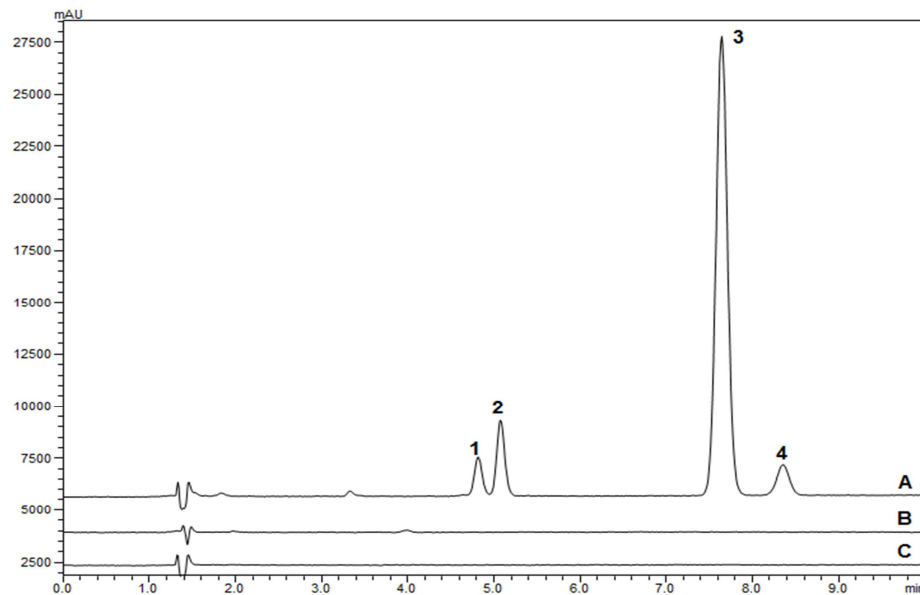


Figura 2. Cromatograma de (A) mistura GF-P407 – (1: Impureza 1; 2: Impureza 2; 3: GF; 4: Impureza 3); (B) P407; (C) diluente (acetonitrila:água).

Linearidade

O método mostrou linearidade significativa entre a área do pico (resposta) e a concentração de GF correspondente, no intervalo de 0,25 – 15,0 µg/mL (figura 3). Obtiveram-se valores de inclinação e intersecção da curva de 68106 e 58.185, respectivamente, e coeficiente de determinação satisfatório ($r^2 > 0,9999$). Não foi observado erro sistemático constante, uma vez que os limites do intervalo de confiança calculados a partir do intercepto incluem o zero. Além disso, o teste de ANOVA da análise de regressão não indicou desvio da linearidade e não foi

observada diferença significativa entre as curvas obtidas em diferentes dias ($p > 0,05$). Também, a análise dos resíduos não indicou falta de ajuste do modelo, nem sugeriram anomalias em sua distribuição.

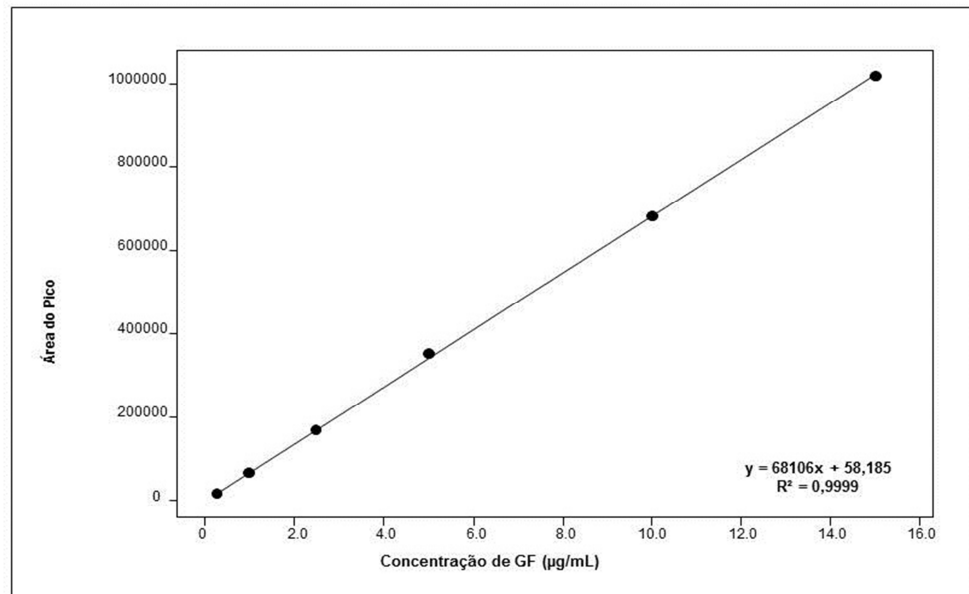


Figura 3. Curva analítica de concentração de GF ($\mu\text{g/mL}$) versus Área do Pico (mAU).

Limite de Detecção (LOD) e Limite e Quantificação (LOQ)

Os valores de LOD e LOQ foram 0,11 e 0,30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Apesar de o primeiro ponto da curva analítica (0,25 $\mu\text{g/mL}$) ser inferior ao limite de quantificação, determinou-se experimentalmente que este foi preciso e exato. Assim, conclui-se que o método possui adequada sensibilidade para a finalidade proposta neste trabalho.

Precisão

A precisão do método foi obtida a partir de três determinações de soluções de GF nas concentrações 0,25, 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$, intradia e interdia (Tabela 1). Os valores para repetibilidade foram inferiores a 1,24%, variando entre 0,25 e 1,24%. Também, teste de ANOVA não demonstrou diferença significativa para as análises realizadas nos diferentes dias ($p > 0,05$). Para a precisão intermediária foram obtidos

valores abaixo de 1,72%, variando entre 1,30 e 1,72%. Os resultados indicaram adequadas repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 1. Determinação da precisão do método analítico (repetibilidade e precisão intermediária)

Repetibilidade (DPR%) ^a				Precisão intermediária (DPR%) ^a
Concentração (µg/mL)	Dia do ensaio			
		1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=3)
0,25	1,21	1,17	1,24	1,72
5,0	0,61	1,20	0,45	1,30
15,0	0,25	0,43	1,22	1,48

^aPrecisão foi expressa como média do desvio padrão relativo (DPR) das replicatas.

Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação de GF adicionada nas concentrações de 0,25; 5,0 e 10,0 µg/mL à amostra contendo P407 e GF em concentração conhecida. Os resultados (Tabela 2) demonstraram recuperação média entre 95,44 e 103,51%, indicando que não há interferência da matriz na quantificação do fármaco. Assim, o método apresentou exatidão adequada.

Tabela 2. Recuperação (%) de padrão de GF em matriz contendo mistura GF-P407

Concentração Adicionada (µg/mL)	Concentração Recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
0,25	0,26	103,51 ± 1,58
5,0	4,77	95,44 ± 1,46
10,0	9,61	96,08 ± 1,03

± DPR (%)

Robustez

O teste de robustez teve por objetivo avaliar o efeito de pequenas mudanças de alguns fatores sobre o analito. Fluxo de eluente e comprimento de onda mostraram afetar significativamente o valor de área do pico ($p < 0,05$). Por outro

lado, a temperatura e a proporção de acetonitrila na fase móvel não demonstraram afetar significativamente a resposta ($p > 0,05$). Assim, estes resultados indicaram que fluxo de eluente e comprimento de onda devem ser rigorosamente controlados, uma vez que estes parâmetros podem afetar significativamente a resposta (concentração de GF).

Tabela 3. Robustez com relação à variação de proporção de acetonitrila, temperatura de forno, fluxo de eluente e comprimento de onda

Proporção de acetonitrila (ACN)				
ACN (%)	Área do Pico			Média
34,5	9,87	9,99	10,02	9,96 ^a
35,0	9,87	10,0	9,99	9,95 ^a
35,5	9,88	9,98	9,99	9,95 ^a

^a Médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes para $p > 0,05$.

Temperatura de forno				
Temperatura (°C)	Área do Pico			Média
33	9,89	10,01	9,99	9,96 ^a
35	9,87	10,0	9,99	9,95 ^a
37	9,88	10,01	10,01	9,97 ^a

^a Médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes para $p > 0,05$.

Fluxo de eluente				
Fluxo (mL/min)	Área do Pico			Média
1,05	10,36	10,46	10,49	10,43 ^a
1,10	9,87	10,0	9,99	9,95 ^b
1,15	9,44	9,55	9,56	9,51 ^c

^{a, b, c} Médias com letras distintas são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Comprimento de onda (λ)				
λ (nm)	Área do Pico			Média
289	9,76	9,74	9,63	9,71 ^a
290	9,87	10	9,99	9,95 ^b
291	10,03	10,16	10,15	10,11 ^b

^{a, b, c} Médias com letras distintas são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Conclusão

Em conclusão, o método de análise proposto, por CLAE, mostrou ser adequado para quantificação de GF em amostras contendo P407, uma vez que

demonstrou ser linear, específico, preciso, exato e robusto. Além disso, através do método proposto foi possível resolver GF das impurezas.

Referências

AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporium canis*—Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 437, p. 277–287, 2012.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 105, p. 158–166, 2013.

ALY, R. et al. Topical griseofulvin in the treatment of dermatophytoses. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 46, p. 43–46, 1994.

ARIDA, A. I.; AL-TABAKHA, M. M.; HAMOURY, H. A. J. Improving the High Variable Bioavailability of Griseofulvin by SEDDS. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 55, n. 12, p. 1713–1719, 2007.

CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 66, p. 303–317, 2007.

CHIAPPETTA, D. A. et al. Synergistic encapsulation of the anti-HIV agent efavirenz within mixed poloxamine/poloxamer polymeric micelles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 7, p. 624–637, 2011.

DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**. v. 23, p. 2709–2728, 2006.

FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 6, p. 189–194, 1996.

FUJIOKA, Y. et al. Prediction of oral absorption of griseofulvin, a BCS class II drug, based on GITA model: Utilization of a more suitable medium for *in-vitro* dissolution study. **Journal of Controlled Release**. v. 119, p. 222–228, 2007.

GOINDI, S.; AGGARWAL, N. Preparation of hydrogels of griseofulvin for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 326, p. 20–24, 2006.

GULL, K.; TRINCI, A. P. J. Griseofulvin inhibits fungal mitosis. **Nature**. v. 244, p. 292–294, 1973.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. 2001, p. 1–25.

International Conference on Harmonization (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005, p. 1–13.

KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 19, n. 1, p. 1–73, 2002.

KAHSAY, G. et al. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 80, p. 9–17, 2013.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 420, p. 1–10, 2011.

KUMAR, S. et al. Drug Carrier Systems for Solubility Enhancement of BCS Class II Drugs: A Critical Review. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 30, n. 3, p. 217–256, 2013.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 453, p. 198–214, 2013.

NOOMEN, A. et al. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs. **Materials Science and Engineering C**. v. 28, p. 705-715, 2008.

REKATAS, C. J. et al. The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 3, p. 4769–4773, 2001.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5. ed. London: Pharmaceutical Press, 918 p. 2005.

VLACHOU, M.D. et al. Development and in vitro evaluation of griseofulvin gels using franz diffusion cells. **International Journal Pharmaceutics**. v. 82, p. 47–52, 1992.

ZOMORODIAN, K. et al. The effect of griseofulvin on the gene regulation of β -tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. **Journal Infectious Chemotherapy**. V. 13, p. 373-379, 2007.

CAPÍTULO III: The poloxamer-enhanced solubility of griseofulvin and its related antifungal activity against *Trichophyton* spp.

(Artigo submetido ao periódico *International Journal of Pharmaceutics*)

O texto completo referente ao capítulo III, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 77 – 99, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em processo de submissão para publicação em periódico científico. Neste capítulo, aborda-se o incremento na solubilização do fármaco griseofulvina, na presença do polímero poloxâmico 407, a interação fármaco-polímero e a possível alteração sobre a atividade antifúngica contra isolados de *Trichophyton metagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

DISCUSSÃO GERAL

Solubilidade é uma propriedade físico-química de fundamental importância para a concepção de medicamentos (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; FATHI-AZARBAYJANI et al., 2016). A escassa solubilidade aquosa é fator limitante para a dissolução do fármaco e, também, para sua absorção, levando a uma biodisponibilidade inadequada, com prejuízo do desempenho terapêutico. Nesse sentido, cresce a importância de tecnologias que viabilizem o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis, com o intuito de se obter medicamentos mais eficazes, resultando em aumento no número de estudos nesse seguimento (KAWABATA et al., 2011; KHADKA et al., 2014). Contudo, verificou-se que esses estudos se limitam, majoritariamente, a aspectos físico-químicos e tecnológicos, presumindo correlação automática entre aumento na solubilidade e melhor atividade biológica, porém desprovidos de comprovação experimental (REKATAS et al., 2001). Assim, destaca-se a importância de estudos tecnológicos associados a estudos biológicos conjuntos e comprobatórios da alteração favorável e significativa na resposta pretendida.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a solubilização de griseofulvina (GF) através de estratégia baseada na interação fármaco-polímero, utilizando o polímero poloxâmero 407 (P407). Também, buscou-se avaliar mais detalhadamente a interação entre GF-P407 e as possíveis alterações no efeito antifúngico. Para melhor elucidação do desenvolvimento do trabalho, a dissertação foi organizada em três capítulos.

O capítulo I foi dedicado à revisão do tema abordado, fornecendo subsídios para o desenvolvimento do trabalho. Além de contextualizarem-se os problemas referentes à escassa solubilidade de fármacos, foram apresentados aspectos referentes às estratégias de solubilização, marcadamente àquelas que são baseadas na interação fármaco-polímero, aos poloxâmeros, polímero estudado, ao fármaco em questão e à atividade pretendida.

Os dados obtidos subsidiaram a escolha da estratégia de solubilização a ser utilizada, indicando que a utilização de polímeros vem destacando-se na inovação e desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas (REKATAS et al., 2001; LU; PARK, 2013). Os polímeros, principalmente aqueles que apresentam características anfifílicas, possibilitam a formulação de fármacos pouco solúveis em meios hidrofílicos, por exemplo, através da solubilização micelar (REKATAS et al., 2001; CHIAPPETTA et al., 2011). As micelas poliméricas são formadas pela

autoassociação dos polímeros, originando estruturas com um domínio hidrofílico e outro domínio hidrofóbico e possibilitando, assim, a solubilização de fármacos pouco solúveis (LU; PARK, 2013). O P407, polímero composto por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), vem sendo amplamente estudado como agente solubilizante de diversos fármacos lipofílicos e, também, utilizado em diferentes tipos de formulações (DUMORTIER et al., 2006; JINDAL; MEHTA, 2015). GF, por sua vez, exemplifica um caso típico de desafio para estudos de aumento de solubilidade, com intuito de melhorar sua atividade e possibilitar um tratamento mais eficaz (AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013). Embora não conste mais entre os antifúngicos de primeira escolha no tratamento de determinadas dermatomicoses, GF continua sendo uma opção terapêutica importante, além de servir como fármaco de referência em diversos estudos. Além disso, a crescente incidência de dermatomicoses e desenvolvimento de resistência dos dermatófitos aos atuais antifúngicos de escolha levam a julgar procedente a investigação de GF como substância modelo.

No capítulo II são descritos o desenvolvimento e validação de um novo método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência, destinado à quantificação de GF em formulações contendo P407. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram estabelecidos a partir de experimentos prévios e com base em métodos já publicados, porém com tempo de análise mais longo (KAHSAY et al., 2013). O método foi validado segundo diretrizes oficiais, ICH (2001, 2005), mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto, na faixa de 0,25 – 15,0 µg/mL.

No capítulo III são apresentados os resultados obtidos nos estudos de solubilização em preparações contendo P407, caracterização físico-química da possível interação fármaco-polímero e avaliação da atividade antifúngica, *in vitro*, de GF, na forma livre e associada ao polímero, frente aos isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

No que se refere ao estudo de solubilização, observou-se aumento efetivo de, aproximadamente, oito vezes a solubilidade intrínseca de GF. Destaca-se o distinto perfil de solubilização GF-P407 obtido neste experimento, que também foi verificado quando P407 foi substituído pelo poloxâmero 124 (P124). Em ambos os casos, os perfis de solubilização diferem do perfil relatado, por exemplo, por LEE e colaboradores (2008) para a solubilização de felodipino com P407. Uma possível

explicação para este fenômeno seria a formação de diferentes arranjos estruturais, que podem incluir micelas, ou coexistência destes em um sistema dinâmico, alterando a capacidade de solubilização (LAWRENCE, 1994; MORTERSEN, 2001; KABANOV; ALAKHOV, 2002). Também, a adição de solutos à dispersão de poloxâmero é capaz de influenciar a autoassociação do polímero (ALEXANDRIDIS et al., 1994; IVANOVA et al., 2000a, 2000b; KABANOV; ALAKHOV, 2002).

Na sequência, os estudos procuraram verificar de que forma se apresenta a interação entre fármaco-polímero. A análise de FT-IR demonstra pelo espectro da mistura física GF-P407 a presença de bandas características das duas substâncias, porém observam-se sutis alterações na intensidade e forma de algumas bandas (regiões de 1.211 cm^{-1} e 1.135 cm^{-1} — estiramentos C—O ligado a anel e C=C—O, respectivamente — de GF; região de 1.100 cm^{-1} — estiramento C—O — de P407). Os resultados sugerem um fenômeno envolvendo o anel cicloexeno. A análise por DSC mostrou um pequeno deslocamento no pico endotérmico do polímero e o desaparecimento do pico endotérmico do fármaco, no termograma da mistura física GF-P407. Os resultados sugerem algum tipo de evento, por exemplo, a fusão do polímero e conseqüente solubilização de GF neste. Também, pode-se sugerir a ocorrência de algum tipo de interação entre GF-P407, resultando na alteração da estrutura cristalina do fármaco e no desaparecimento do pico. O espectro de ^1H RMN demonstrou espectros característico tanto para GF quanto para P407. No espectro da mistura GF-P407 constatou-se a presença dos sinais característicos de ambas as substâncias, entretanto não permitiu observação de possível interação entre fármaco e polímero. Provavelmente, esteja ocorrendo interferência do solvente utilizado. Estudos complementares, como RMN bidimensional com correlação homonuclear, estão em andamento.

Através da espectroscopia de correlação de fótons, P407 mostrou distribuição bimodal ou trimodal, nas concentrações mais baixas de polímero, e índice de polidispersão de acordo com as características de distribuição do sistema. Porém, verificou-se uma tendência à distribuição monomodal, na medida em que a concentração de P407 foi aumentada, acompanhada de diminuição do valor de índice de polidispersão. Os dados encontrados para tamanho de partícula estão de acordo com o esperado para micelas poliméricas (CHIAPPETTA et al., 2011). Foram observados comportamento e valores similares entre as amostras contendo apenas P407 e as amostras contendo mistura GF-P407, demonstrando não haver

interferência do fármaco nessas variáveis. O potencial ζ mostrou valores negativos, conforme esperado para P407. No entanto, foi observado que para o incremento de concentração de P407 ocorreu uma diminuição do valor de potencial ζ . Foi constatada clara diferença entre os valores de potencial ζ para mistura GF-P407 e P407 sozinho. Em contrapartida, os valores de condutividade aumentaram consideravelmente conforme se elevou a concentração de polímero. Os dados obtidos através das análises de espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética não permitiram uma elucidação clara do fenômeno. Apenas, os resultados obtidos para potencial ζ nos permitem sugerir que algum evento entre GF-P407 resultaria em uma diminuição em relação ao valor encontrado para o polímero sozinho. As análises realizadas pelos métodos de análise multivariada de componentes principais (ACP) e de agrupamento hierárquico (AAH) corroboram os dados explanados.

Em outro momento, observou-se o comportamento das impurezas de síntese de GF, presentes no cromatograma obtido por CLAE, e suas estruturas químicas. Com base no trabalho de KAHSAY e colaboradores (2013), acredita-se que essas impurezas correspondam a ácido griseofulvínico, decolorgriseofulvina e deidrogriseofulvina. Verificou-se distinto perfil de solubilização para o ácido griseofulvínico que, diferentemente de GF e demais impurezas, não apresenta insaturação em C_2-C_3 e, por conseguinte, o dieno conjugado com a cetona cíclica. Em associação com as análises por FT-IR, é possível sugerir que essa região da molécula possa vir a participar na solubilização de GF pelo P407. Estudos para a elucidação estrutural e confirmação das impurezas estão em andamento.

O teste de susceptibilidade para a atividade antifúngica de GF-P407, em comparação com GF livre, não revelou qualquer melhoria da atividade. Pelo contrário, pode-se constatar que houve até detrimento desta. Esses dados indicaram que o incremento de solubilização de GF na presença de P407 não se refletiu em uma melhor atividade antifúngica.

Em resumo, o capítulo III evidencia que P407 foi efetivo quanto ao incremento de solubilidade de GF, sendo a interação GF-P407 sugerida pelos ensaios de caracterização. No entanto, não se constatou relação direta entre o aumento de solubilidade de GF e a atividade biológica objetivada.

CONCLUSÕES

- O método analítico para quantificação de GF em amostras contendo P407 por CLAE-PDA mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto nas condições experimentais utilizadas. Também, o método foi capaz de resolver adequadamente GF de suas impurezas;
- A associação com P407 leva a um aumento efetivo de até oito vezes a solubilidade intrínseca da GF, e o perfil de solubilização diferiu daquele relatado na literatura;
- Ensaio de caracterização por FT-IR, DSC, ^1H RMN, espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética sugeriram a ocorrência de interações fármaco-polímero, porém, sem elucidar claramente o fenômeno;
- O perfil de solubilização das impurezas de síntese de GF mostraram similitudes com o próprio fármaco, exceto para a impureza ácido griseofulvínico, que não possui, como as outras estruturas, insaturação no anel cicloexeno;
- Não foi constatada relação direta entre a maior susceptibilidade fúngica e o incremento de solubilização de GF, verificando-se, inclusive, um aumento na CIM frente a alguns dos isolados testados;
- Vários dos resultados acima elencados diferem frontalmente com os encontrados na literatura, fato que sugere a necessidade de estudos complementares e corroborativos.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 105, p. 158–166, 2013.
- ALEXANDRIDIS, P. et al. Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. **Langmuir**. v. 10, p. 2604–2612, 1994.
- CHIAPPETTA, D. A. et al. Synergistic encapsulation of the anti-HIV agent efavirenz within mixed poloxamine/poloxamer polymeric micelles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 7, p. 624–637, 2011.
- DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**. v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.
- FATHI-AZARBAYJANI, A. et al. Measurement and correlation of deferiprone solubility: Investigation of solubility parameter and application of van't Hoff equation and Jouyban–Acree model. **Journal of Molecular Liquids**. v. 215, p. 339–344, 2016.
- FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 690 p. 2011.
- IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 1. Phase Diagrams and Structure Identification. **Langmuir**. v. 16, p. 3660–3675, 2000a.
- IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Evolution in Structural Polymorphism of Pluronic F127 Poly(ethyleneoxide)-Poly(propyleneoxide) Block Copolymer in Ternary Systems with Water and Pharmaceutically Acceptable Organic Solvents: From “Glycols” to “Oils”. **Langmuir**. v. 16, p. 9058–9069, 2000b.
- JINDAL, N.; MEHTA, S. K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 129, p. 100–106, 2015.
- KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 19, n. 1, p. 1–73, 2002.
- KAHSAY, G. et al. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 80, p. 9–17, 2013.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 420, p. 1–10, 2011.

KHADKA, P. et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutics Sciences**. v. 9, p. 304–316, 2014.

LAWRENCE, M. J. Surfactant Systems: Their Use in Drug Delivery. **Chemical Society Reviews**. p. 417–424, 1994.

LEE, K-R. et al. Effect of Poloxamer on the Dissolution of Felodipine and Preparation of Controlled Release Matrix Tablets Containing Felodipine. **Archives of Pharmacal Research**. v. 31, n. 8, p. 1023–1028, 2008.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 453, p. 198–214, 2013.

MORTENSEN, K. et al. Structural Properties of Self-assembled Polymeric Aggregates in Aqueous Solutions. **Polymers For Advanced Technologies**. v. 12, p. 2–22, 2001.

REKATAS, C. J. et al. The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 3, p. 4769–4773, 2001.