

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Alexandre Machado Rubim

**DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO COMO
ESTRATÉGIA PARA O INCREMENTO DA SOLUBILIDADE DE
AMIODARONA**

Santa Maria, RS
2016

Alexandre Machado Rubim

**DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO COMO ESTRATÉGIA
PARA O INCREMENTO DA SOLUBILIDADE DE AMIODARONA**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS
2016

Alexandre Machado Rubim

**DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO COMO ESTRATÉGIA
PARA O INCREMENTO DA SOLUBILIDADE DE AMIODARONA**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Clarice Madalena Bueno Rolim, Prof^a. Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Andrea Adams, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

Sergio Mortari, Prof. Dr. (UNIFRA)

Simone Cardoso, Prof^a. Dr^a. (UFSC)

Helder Teixeira, Prof. Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 02 de dezembro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha AMADA ESPOSA JAQUELINE BANDEIRA RUBENICK, à minha MÃE CLENECIR MACHADO RUBIM e ao meu PAI FLÁVIO RUBIM.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre depositou confiança e acreditou em mim, em especial à minha esposa, Jaqueline Bandeira Rubenick, que sempre esteve ao meu lado me dando força e me incentivando para continuar mesmo nas horas mais difíceis.

Também gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à minha orientadora Clarice Madalena Bueno Rolim, pela oportunidade que me foi dada, pela ajuda nas horas que precisei, amizade e confiança depositada em mim durante todo este período. Aos meus amigos e colegas do Centro Universitário Franciscano: Luciane Varini Laporta e Marcos Roberto dos Santos, pelos momentos de discussão de alguns resultados e à Rosimar Leitenberg da Silveira, pela grande ajuda e conselhos durante o desenvolvimento farmacotécnico e produção dos comprimidos.

RESUMO

DISPERSÕES SÓLIDAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO COMO ESTRATÉGIA PARA O INCREMENTO DA SOLUBILIDADE DE AMIODARONA

AUTOR: Alexandre Machado Rubim
ORIENTADORA: Clarice Madalena Rolim

O presente estudo teve como objetivo desenvolver dispersões sólidas (DS) e complexos de inclusão (CI) utilizando como carreadores os polímeros hidrofílicos (polietilenoglicóis PEGs 1500, 4000 e 6000) e ciclodextrinas (CDs) (β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) respectivamente, com a finalidade de verificar a influência de cada abordagem tecnológica na solubilidade do Cloridrato de Amiodarona (AMH). DS foram preparadas nas proporções AMH:PEGs de 1:1 e 1:10 (p/p) pelos métodos de fusão e amassamento. Os CI foram preparados pelos métodos de coevaporação, *freeze-drying* e *spray-drying* utilizando a proporção AMH:CDs de 1:1 (p/p). Para ambas as abordagens, foram obtidos diagramas de solubilidades do tipo A_L e propriedades termodinâmicas favoráveis as formações destas novas entidades sólidas. A solubilidade do AMH em diferentes meios fisiológicos (tampão ácido 1,2; tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e água) demonstrou uma forte dependência da sua ionização devido à presença do grupo químico amina, o qual se ioniza em maior proporção em ambientes mais ácidos, ou seja, abaixo do pKa do AMH (6,56). Com a finalidade de caracterizar as DS e CI foram utilizadas diferentes técnicas como difração de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética nuclear do próton (RMN), determinação da área superficial específica das partículas (ASE), estudos de modelagem molecular (MM), assim como a determinação dos perfis de dissolução entre o AMH puro e os produtos sólidos obtidos. A partir das análises de DRX, FT-IR e DSC foi possível verificar uma forte interação em nível molecular entre o AMH e os carreadores estudados. Com o auxílio das análises de MEV e ASE foi constatada uma alteração morfológica dos cristais do AMH após a formação dos CI, assim como um aumento da área superficial das partículas em relação ao AMH puro. Para a determinação da porção da molécula do AMH que se encontra dentro da cavidade da ciclodextrina, foram utilizadas a RMN e a MM. Os espectros de RMN mostraram um forte indício de que o processo de complexação com a metil- β -ciclodextrina ocorreu pelo lado lipofílico, constituído por um grupo dietilamina. A MM foi realizada a partir do CI contendo AMH e metil- β -ciclodextrina com a finalidade de determinar as energias de ligação, quantidade de carga transferida e as distâncias entre os principais átomos. Conforme os resultados, constatou-se uma forte interação entre o grupo dietilamina do AMH com a cavidade da metil- β -ciclodextrina, formando um complexo estável com energia de ligação de 0,76 eV, confirmando assim os resultados encontrados por RMN. Os perfis de dissolução obtidos demonstraram sofrer grande influência do tipo de DS e CI, assim como dos métodos de preparo destes produtos. Também foram desenvolvidas 3 formulações para obtenção de comprimidos de liberação imediata contendo 10 mg de AMH complexado com metil- β -ciclodextrina por compressão direta. Os lotes foram submetidos aos ensaios de controle de qualidade, sendo que a formulação 1 apresentou friabilidade superior a 1,5%, tornando esta formulação imprópria para a realização dos perfis de dissolução e continuidade dos estudos. Os comprimidos obtidos a partir das formulações F2 e F3 apresentaram resultados satisfatórios em relação aos ensaios de variação de peso, dureza, friabilidade, tempo de desintegração e doseamento do AMH. Estas duas formulações foram selecionadas para realização dos perfis de dissolução utilizando água e tampão acetato pH 4,5. Para ambos os meios avaliados, houve um aumento na quantidade dissolvida de AMH a partir dos comprimidos em relação ao AMH puro, demonstrando que os CI podem ser estratégias uteis no desenvolvimento farmacotécnico de novas formas farmacêuticas sólidas orais.

Palavras-chave: Dispersão sólida. Complexo de inclusão. Comprimidos. Perfil de dissolução. Cloridrato de Amiodarona.

ABSTRACT

SOLID DISPERSION AND INCLUSION COMPLEX AS STRATEGY FOR THE ENHANCEMENT OF AMIODARONE SOLUBILITY

AUTHOR: Alexandre Machado Rubim

ADVISOR: Clarice Madalena Rolim

This study aimed to develop solid dispersions (SD) and inclusion complex (IC) using as carriers hydrophilic polymers (polyethylene glycol PEGs 1500, 4000 and 6000) and cyclodextrins (CDs) (β -cyclodextrin, methyl- β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin), respectively, in order to verify the influence of each technological approach in the solubility of Amiodarone Hydrochloride (AMH). SD was prepared in the proportion AMH:PEGs of 1:1 and 1:10 (w/w) by the fusion and kneading techniques. IC were prepared by co-evaporation, freeze-drying and spray-drying methods, and the proportion AMH: CD of 1:1 (w/w) was used. For both approaches, A_L -type solubility diagrams and thermodynamic approaches favorable to the formation of this new solid entity were obtained. The AMH solubility in different physiological media (acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8 and water) showed a strong dependence of its ionization due to the presence of amine chemical, which ionizes itself in a greater proportion in more acid means, below the AMH pK_a (6.56). In order to characterize SD and CI, different techniques were used, such as X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electronic Microscopy (SEM), Proton Nuclear Magnetic Resonance (RMN), determination of Specific Surface Area of the particles (SBET) and studies about Molecular Modeling (MM), as well as the determination of dissolution profiles between pure AMH and the solid products obtained. From the DRX, FT-IR and DSC analysis, it was possible to verify a strong interaction in a molecular level between AMH and the studied carriers. With the aid of SEM and SSA analysis, it was diagnosed a morphological alteration on the AMH crystals after the IC formation, as well as an increase of the superficial area of the particles in relation to pure AMH. For the determination of each portion of AMH molecule that is inside the cyclodextrin cavity, RMN and MM were used. RMN spectra showed strong evidence that the complexation process with methyl- β -cyclodextrin occurred by the lipophilic side, constituted by a diethylamide group. MM was used from an IC containing AMH and methyl- β -cyclodextrin in order to determine the binding energy, amount of charge transferred and the distances between the principal atoms. According to the results, it was determined a strong interaction between the diethylamide group of AMH with the methyl- β -cyclodextrin cavity, compounding a stable complex with the binding energy of 0.76 eV, confirming the results found by RMN. The obtained dissolution profiles showed to suffer a great influence of SD and CI, as well as the preparation methods of these products. It was also developed three formulations for the obtainment of immediate release tablets containing 10 mg de AMH complex with methyl- β -cyclodextrin by direct compression. The batches were submitted to tests of quality control, and the formulation 1 presented friability superior to 1.5%, which rendered this formulation improper for the execution of dissolution profiles and continuation of the studies. The tablets obtained from the F2 and F3 formulations presented satisfactory results in relation to the tests of variation of weight, hardness, friability, disintegration time and AMH content. These two formulations were selected for the execution of dissolution profiles using water and acetate buffer pH 4.5. For both evaluated mediums, there was an increase in the dissolved amount of AMH from the tablets in relation to the pure AMH, demonstrating that IC can be useful strategies in the pharmacotechnical developments of new solid oral pharmaceutical ways.

Key-words: Solid Dispersion. Inclusion Complex. Tablets. Dissolution Profile. *Amiodarone Hydrochloride*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 –	Estrutura química do Cloridrato de Amiodarona.....	22
Figura 3.2 –	Estrutura química da α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ - ciclodextrina.....	28
Figura 4.1 –	Espectros na região do ultravioleta/visível obtidos a partir de soluções contendo SQR de cloridrato de amiodarona (A) e MP de cloridrato de amiodarona (B), em concentração de 10 μ g/mL, utilizando metanol como solvente.....	37
Figura 4.2 –	Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de: SQR de cloridrato de amiodarona (A) e MP de cloridrato de amiodarona (B), preparados em pastilhas de KBr.....	38
Figura 4.3 –	Ressonância Magnética Nuclear do (1 H) para cloridrato de amiodarona MP.....	39
Figura 5.1 –	Representação gráfica da curva analítica para AMH SQR.....	44
Figura 5.2 –	Espectros correspondentes a: PEG 1500 (A), PEG 4000 (B), PEG 6000 (C), Metil- β -ciclodextrina (D), 2-HP- β -ciclodextrina (E) e β - ciclodextrina (F).....	49
ARTIGO 1		
Figura 1 –	Phase solubility curves of AMH in aqueous solutions of (A) PEG 1500, (B) PEG 4000 and (C) PEG 6000 at 25 and 37 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C (n = 3).....	61
Figura 2 –	FT-IR of the AMH pure (A), PEG 6000 (B) and solid dispersion by fusion method (C).....	63
Figura 3 –	X-ray diffraction patterns of AMH, physical mixture and solid dispersions.....	64
Figura 4 –	Drug release profiles of pure AMH, physical mixture and solid dispersions obtained from fusion and kneading methods using water as dissolution medium at 37 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C and carrier PEG 4000 (A) and carrier PEG 6000 (B).....	65
Figura 5 –	Drug release profiles of pure AMH, physical mixture and solid dispersions obtained from fusion and kneading methods using acetate buffer pH 4.5 as dissolution medium at 37 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C and carrier PEG 4000 (A) and carrier PEG 6000 (B).....	66

ARTIGO 2

Figura 1 –	Phase solubility diagrams of AMH in the presence of cyclodextrins in (A) 25 °C and (B) 37 °C ± 0.5 °C (<i>n</i> = 3).....	79
Figura 2 –	X-ray diffractograms corresponding to: (A): 1 – AMH, 2 - β-CD, 3 – AMH/β-CD/PM, 4 – AMH/β-CD/CE, 5 – AMH/β-CD/SD, 6 – AMH/β-CD/FD, (B): 1 – AMH, 2 - Methyl-β-CD, 3 – AMH/Methyl-β-CD/PM, 4 – AMH/Methyl-β-CD/CE, 5 – AMH/Methyl-β-CD/SD, 6 – AMH/Methyl-β-CD/FD and (C): 1 - AMH, 2 - HP-β-CD, 3 – AMH/HP-β-CD/PM, 4 – AMH/HP-β-CD/CE, 5 – AMH/HP-β-CD/SD, 6 - AMH/HP-β-CD/FD.....	81
Figura 3 –	DSC thermograms: 1: (A) AMH powder, (B) physical mixture, (C) spray-dried, (D) coevaporated, (E) β-CD and (F) freeze-dried; 2: (A) AMH powder, (B) spray-dried, (C) coevaporated, (D) physical mixture, (E) freeze-dried and (F) Methyl-β-CD; and 3: (A) AMH powder, (B) spray-dried, (C) coevaporated, (D) physical mixture, (E) freeze-dried and (F) HP-β-CD.....	83
Figura 4 –	Scanning Electronic Microscopic of AMH, beta-CD, methylbeta-CD, hydroxypropylbeta-CD, AMH/beta-CD/PM (1A), AMH/beta-CD/CE (1B), AMH/beta-CD/SD(1C),AMH/beta-CD/FD(1D),MH/methylbeta-CD/PM (2A), AMH/methylbeta-CD/CE (2B), AMH/methylbeta-CD/SD(2C),AMH/methylbeta-CD/FD(2D), AMH/hydroxypropylbeta-CD/PM(3A),AMH/hydroxypropylbetaCD/CE(3B),AMH/hydroxypropylbeta-CD/SD(3C)andAMH/hydroxypropylbeta-CD/FD(3D).....	85
Figura 5 –	Dissolution curves of AMH powder and different formulations using: (A) water, (B) acid buffer pH 1.2, (C) acetate buffer pH 4.5 and (D) phosphate buffer pH 6.8 as dissolution medium at 37 °C ± 0.5 °C.....	87

ARTIGO 3

Figura 1 –	Phase solubility of AM in the presence of Methyl-β-CD at 25 °C (<i>n</i> = 3).....	102
Figura 2 –	X-ray powder diffraction spectra of AM (A), AM-Methyl-β-CD inclusion complex (B) and Methyl-β-CD (C).....	104
Figura 3 –	DSC thermograms of: AM (A), Methyl-β-CD (B) and AM-Methyl-β-CD inclusion complex (C).....	105

Figura 4 –	FT-IR spectra of AM (A), AM-Methyl- β -CD inclusion complex (B) and Methyl- β -CD (C).....	106
Figura 5 –	^1H NMR spectra of AM (A), AM-Methyl- β -CD inclusion complex (B) and Methyl- β -CD (C).....	107
Figura 6 –	Structural configurations of the inclusion complexes of AM with Methyl- β -CD with different orientations as obtained from <i>ab initio</i> calculation. (a) top, (b) side, (c) bottom views of the AM-Methyl- β -CD-I inclusion complex. (d) top, (e) side, (f) bottom views of the AM-Methyl- β -CD-II inclusion complex.....	108
Figura 7 –	SEM photographs of AM (A), Methyl- β -CD (B); and AM-Methyl- β -CD inclusion complex (C).....	109
Figura 8 –	Dissolution profile obtained with AM powder and AM-Methyl- β -CD inclusion complex from matrix tablets F2.....	111
Figura 9 –	Dissolution profile obtained with AM powder and AM-Methyl- β -CD inclusion complex from matrix tablets F3.....	111
Figura 9.1	Possíveis variações dos complexos entre molécula hóspede e ciclodextrinas.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Produtos que utilizam a técnica de dispersão sólida aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA).....	27
Tabela 3.2 –	Formas farmacêuticas disponíveis no mercado mundial.....	30
Tabela 4.1 –	Frequências dos principais grupos de absorção do AMH.....	38
Tabela 4.2 –	Valores referentes aos respectivos deslocamentos químicos do (¹ H) e sua localização na estrutura química.....	40
Tabela 5.1 –	Condições cromatográficas para a quantificação do AMH em DS e CI por CLAE.....	43
Tabela 5.2 –	Valores das áreas obtidas a partir da curva padrão do AMH SQR por CLAE.....	44
Tabela 5.3 –	Análise de variância da curva padrão de AMH SQR.....	45
Tabela 5.4 –	Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade do AMH em DS.....	45
Tabela 5.5 –	Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária do AMH em DS.....	46
Tabela 5.6 –	Variações propostas no método original.....	47
Tabela 5.7 –	Resultados obtidos no ensaio de robustez do método.....	48
Tabela 5.8 –	Resultados obtidos a partir do doseamento do AMH nas dispersões sólidas preparadas a partir de diferentes métodos.....	50
Tabela 5.9 –	Resultados obtidos a partir do doseamento do AMH nos complexos de inclusão preparados a partir de diferentes métodos.	50
ARTIGO 1		
Tabela 1 –	Solubility values of AMH in different dissolution media at 37 °C ± 0.5 °C	60
Tabela 2 –	Parameters for phase solubility studies of AMH obtained with different carriers at 25 and 37 °C ± 0.5 °C.....	62
ARTIGO 2		
Tabela 1 –	Thermodynamic parameters obtained from phase solubility studies with AMH and cyclodextrins at different temperatures (values are the mean ± SD of triplicate experiments).....	80
ARTIGO 3		
Tabela 1 –	Composition of matrix tablets of AM-Methyl-β-CD inclusion	

	complex.....	101
Tabela 2 –	Variation of the ¹ H NMR chemical shifts of AM before and after inclusion complex.....	107
Tabela 3 –	Results of smallest distances, binding energies and charge transfers for different configurations (positive values indicate that the Methyl-β-CD is an electron acceptor).....	109
Tabela 4 –	Physical properties and drug content of AM-Methyl-β-CD inclusion complex tablets.....	110

SUMÁRIO

Capítulo 1-	Introdução.....	15
Capítulo 2-	Objetivos.....	18
Capítulo 3-	Revisão de literatura.....	20
Capítulo 4-	Caracterização da matéria-prima.....	35
Capítulo 5-	Desenvolvimento e validação de método para quantificação do cloridrato de amiodarona em dispersão sólida e complexo de inclusão.....	41
Capítulo 6-	Publicação 1 - Amiodarone hydrochloride: enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion techniq.....	53
Capítulo 7-	Artigo 2 - Inclusion complex of amiodarone hydrochloride with cyclodextrins: preparation, characterization and dissolution rate evaluation.....	73
Capítulo 8-	Artigo 3 - Inclusion complexes of amiodarone hydrochloride and methyl- β -cyclodextrin: formulation, characterization and in vitro dissolution profile of immediate release tablets.....	94
Capítulo 9-	Discussão geral e conclusões.....	117
	Referências.....	131

O coração é um órgão que tem por função suprir as demais partes do corpo humano com sangue necessitando, assim, que seus componentes mecânicos e elétricos trabalhem de forma precisa e concomitante. A partir de uma falha nos componentes elétricos, ocorre uma deficiência no controle do ritmo com que os componentes mecânicos irão enviar o sangue para os demais órgãos, caracterizando assim a arritmia cardíaca (GOODMAN; GILMAN, 2005; GOLAN et al., 2009).

As arritmias são uma das principais causas de mortalidade e frequentemente aparecem juntas com outras patologias como insuficiência cardíaca, isquemia e hipertensão. Sua recuperação clínica é muito variável, desde pacientes que não necessitam de tratamento farmacológico, assim como, pacientes que precisam realizar um tratamento rigoroso e prolongado (FLÓREZ; ARMIJO; MEDIIVILLA, 2008).

De acordo com Vaughan Willims (1970), o Cloridrato de Amiodarona (AMH) é um agente antiarrítmico da classe III, utilizado para o tratamento de arritmias ventriculares e supraventriculares. Os principais efeitos adversos relatados a partir do uso crônico deste fármaco são fibrose pulmonar, pancreática e hepática e disfunção da glândula tireoide (AMICO et al., 1984; BASARIA; COOPER, 2005; KURUMA et al., 2009). Pertencendo à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) apresenta uma elevada permeabilidade celular e uma baixa solubilidade aquosa, depositando-se principalmente em tecidos adiposos, fígado, pulmões e tireoide (PAPIRIS et al., 2010).

No mercado nacional é comercializado nas formas farmacêuticas de comprimido, em concentrações de 100 mg e 200 mg, e solução injetável, em concentração de 50 mg/mL (ANVISA, 2015).

A baixa solubilidade aquosa dos fármacos pertencentes a classe II (SCB) tem gerado um especial interesse por parte da comunidade científica assim como pelas indústrias farmacêuticas em desenvolver novas estratégias para a melhoria desta propriedade, principalmente em produtos administrados via oral, uma vez que estes fármacos apresentam a taxa de dissolução como um passo limitante para absorção e biodisponibilidade.

Com a finalidade de sanar estes problemas, a formação de dispersões sólidas amorfas e complexos de inclusão tornam-se alternativas úteis, uma vez que estes sistemas promovem um aumento significativo na dissolução da partícula e, conseqüentemente, uma melhor absorção da molécula ativa, assim como uma possível redução dos efeitos adversos (SERAJUDDIN, 1999; LEUNER; DRESSMAN, 2000; LIPINSKI, 2002; STREUBEL et al., 2006; POUTON et al., 2010).

Pelo fato do AMH apresentar importantes efeitos adversos, dose dependentes, limitada solubilidade em fluidos fisiológicos, absorção e biodisponibilidade variáveis, este fármaco é considerado um adequado candidato para o desenvolvimento de dispersões sólidas utilizando matrizes hidrofílicas e complexos de inclusão com ciclodextrinas, buscando atender a necessidade de obtenção de um produto que apresente uma maior taxa de dissolução em um menor intervalo de tempo e, conseqüentemente, um melhor comportamento biofarmacêutico.

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar sistemas amorfos contendo dispersões sólidas e complexos de inclusão, assim como desenvolver uma forma farmacêutica sólida de liberação imediata contendo o Cloridrato de Amiodarona.

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento tecnológico de sistemas amorfos contendo Cloridrato de Amiodarona e produzir de uma forma farmacêutica sólida oral.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar do Cloridrato de Amiodarona matéria-prima, por espectrofotometria na região do ultravioleta/visível, região do infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear do próton (^1H);
- ✓ Desenvolver e validar método para quantificação do Cloridrato de Amiodarona em dispersão sólida e complexo de inclusão;
- ✓ Preparar e caracterizar dispersões sólidas contendo Cloridrato de Amiodarona em polietilenoglicol 1500, 4000 e 6000;
- ✓ Preparar e caracterizar complexos de inclusão contendo Cloridrato de Amiodarona em β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina;
- ✓ Desenvolver uma forma farmacêutica sólida oral de liberação imediata contendo Cloridrato de Amiodarona utilizando o processo tecnológico mais adequado.

3.1 Arritmia cardíaca e tratamento

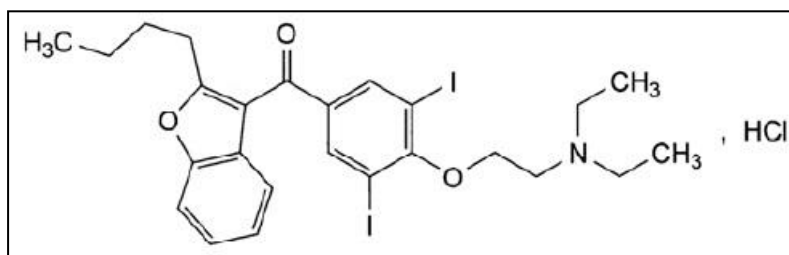
Para o envio de uma quantidade adequada de sangue aos diversos órgãos do corpo humano, os componentes mecânicos e elétricos do coração devem atuar em extrema harmonia. Componentes mecânicos têm por função enviar o sangue enquanto que os componentes elétricos trabalham no controle do ritmo deste envio. A partir de um mau funcionamento dos componentes elétricos, os miócitos cardíacos perdem a função de contração sincronizada, ocorrendo alterações no potencial das membranas das células o que afeta diretamente o ritmo cardíaco, caracterizando assim a arritmia. É neste sentido que os fármacos antiarrítmicos atuam, ou seja, possuem função de modular a atividade dos canais iônicos na membrana plasmática (GOLAN et al., 2009).

Em 1970, Vaughan Williams propôs uma classificação para os fármacos utilizados no tratamento das arritmias cardíacas com base em seus efeitos eletrofisiológicos. A classe I é composta por fármacos que têm por função bloquear os canais de sódio (disopiramida, lidocaína, flecainida, propafenona); a classe II apresenta os fármacos antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, sendo o principal representante o propranolol; os fármacos pertencentes à classe III têm por função prolongar o potencial de ação cardíaco através do bloqueio dos canais de potássio (cloridrato de amiodarona, dronedarona, sotalol) e na classe IV encontram-se os fármacos bloqueadores dos canais de cálcio (verapamil, diltiazem).

3.2 Cloridrato de amiodarona (AMH)

Possuindo o nome químico de Cloridrato de (2-butil-3-benzofuranil)-[4-[2-(dietilamino)etoxi]-3,5-diidrofenil]-metanona, Figura 1, o AMH apresenta-se como um pó branco constituído por partículas que formam um sistema cristalino do tipo monoclinico, sendo praticamente insolúvel em água, solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol e muito pouco solúvel em *n*-hexano (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012; TRUMBORE et al., 1988).

Figura 3.1 - Estrutura química do Cloridrato de Amiodarona
(THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012)



Apresenta baixa solubilidade aquosa (0,2 – 0,5 mg/mL) a 25 °C e possui elevada lipofilicidade, $\log P = 7,57$. Sua cadeia alifática alquila e anéis aromáticos promovem fortes ligações nas membranas lipídicas. Devido à sua baixa solubilidade, há uma dificuldade na determinação do seu pKa, sendo que diferentes valores são encontrados na literatura 5,6; 7,4 e 6,56 (ANDREASEN et al., 1981; BONATI et al., 1984; JENDRASIAK et al., 1990).

Sua absorção se dá de forma lenta e variável e o início de sua ação ocorre a partir de 2 dias a 3 semanas após administração oral. Apresenta volume de distribuição de 66 L/Kg e alta ligação às proteínas, em torno de 96%. O AMH é metabolizado no fígado via citocromo P-450 pela enzima CYP3A originando o metabólito *N*-desetilamiodarona (DEA). Possui biodisponibilidade oral de 35% a 65%, concentração plasmática efetiva de 0,5 – 2,5 µg/mL e meia vida de eliminação de 40 a 55 dias (LAPINSKY; MULLEN; BALTER, 1993; LACY et al., 2011).

O AMH é um dos fármacos mais potentes da sua classe para o tratamento de arritmias ventricular e supraventricular. Tem por função prolongar o potencial de ação cardíaco devido ao bloqueio dos canais de potássio. O AMH é considerado um dos fármacos mais prescritos da sua classe, porém junto a essa terapia estão associados importantes efeitos adversos como fibrose pulmonar, hepática e pancreática, despigmentação da pele, tornando-a cinza-azulada, deposição na córnea, disfunção da glândula tireoide, ainda podendo causar tontura, distúrbios do sono, tremor (GILL; HEEL; FITTON, 1992; LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2009; LACY et al., 2011; RANG et al., 2012).

De acordo com Vassallo e Trohman (2007), Babatin; Lee e Pollak (2008) e Roden (1999), os efeitos adversos do AMH estão relacionados com a dose administrada e propriedades intrínsecas da molécula entre elas: meia vida de eliminação, em média de 48 dias, variável biodisponibilidade, presença de iodo em sua estrutura química e grande potencial para interação com outros fármacos, devido à inibição do complexo enzimático citocromo P450 e proteína de efluxo p-glicoproteína.

De acordo com Hostetler e colaboradores (1988), Massey e colaboradores (1995), Reasor e Kacew (1996), os mecanismos de toxicidade do AMH incluem citotoxicidade direta, desenvolvimento de fosfolipidose lisosomal e desestabilização das membranas.

Papires e colaboradores (2007) e Roth e colaboradores (2013) sugerem que a presença do AMH e seu metabólito (DEA) juntos em células epiteliais pulmonares humana possa resultar em um efeito tóxico sinérgico ou um efeito maior quando comparado ao efeito proporcionado por eles de forma individual.

Outras evidências da potencial toxicidade produzida pelo AMH estão nos resultados obtidos por Golli-Bennour e colaboradores (2012), onde através de ensaios de viabilidade celular utilizando células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2), células renais de macaco (Vero) e células de cordão umbilical humano (EAhy 926), observou-se uma redução da viabilidade celular, dose dependente, dentro do intervalo de 20 a 180 μM , sendo as células Vero mais sensíveis quando comparadas às HepG2.

Também neste estudo avaliou-se o estresse oxidativo produzido pelo AMH através da medida de produção de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) usados como biomarcadores da peroxidação lipídica. O estudo mostrou uma indução de peroxidação lipídica, dose dependente, produzida pelo AMH para todas as linhagens de células. Os maiores níveis de MDA foram encontrados para Vero ($44,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ na IC_{50}), seguido de EAhy 926 ($17,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ na IC_{50}) e HepG2 ($7,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ na IC_{50}), sendo o perfil de expressão de 4-HNE de Vero ($398\% \pm 2,4 \mu\text{M}$ na IC_{50}), seguido de EAhy 926 ($248\% \pm 3,1 \mu\text{M}$ na IC_{50}) e HepG2 ($168\% \pm 4,03 \mu\text{M}$ na IC_{50}).

3.3 Dispersões Sólidas (DS) e Complexos de Inclusão (CI)

Fármacos de baixa solubilidade geralmente demonstram comportamento *in vivo* inferior à fármacos com alta solubilidade, acarretando, assim, problemas no desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas, como também promovendo inúmeros desafios em relação ao comportamento biofarmacêutico e ao desenvolvimento de métodos de dissolução discriminativos que apresentem potencial correlação *in vitro/in vivo* (BROWN et al., 2004).

Um aumento da solubilidade em fluidos biológicos, permeabilidade celular, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas, pode ser obtido a partir de diferentes estratégias farmacotécnicas, entre elas uma simples micronização das partículas, desenvolvimento de DS e CI, até o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados (FERRAZ, 2011; VEMULA; LAGISHETTY; LINGALA, 2010).

3.3.1 Dispersão sólida

DS são sistemas nos quais uma ou mais moléculas ativas estão dispersas em um carreador ou matriz inerte solúvel em água, sendo este sistema produzido por diferentes métodos como fusão dos componentes, evaporação de solvente, amassamento, secagem por aspersão e fluido supercrítico (CHIOU; RIEGELMAN, 1971; MODI; TAYADE, 2006; SAMMOUR et al., 2006). As DS dividem-se em três gerações, sendo estas classificadas de acordo com os componentes utilizados:

✓ **Primeira geração:** formada por uma mistura de molécula ativa com carreadores altamente solúveis em água, como uréia e manitol, apresentando como principal característica a formação de DS cristalinas, ou seja, a molécula ativa encontra-se na forma de cristais estáveis termodinamicamente quando comparada à forma amorfa da mesma molécula.

✓ **Segunda geração:** formada por carreadores amorfos promovendo, assim, uma amorfização da molécula ativa. Os principais carreadores utilizados são polivinilpirrolidona, polietilenoglicóis, hidroxipropilmetilcelulose entre outros.

✓ **Terceira geração:** caracterizada pela manutenção dos componentes da segunda geração, porém ocorre a adição de um tensoativo que auxilia na molhabilidade da partícula, promovendo, assim, um efeito sinérgico na solubilidade do fármaco reduzindo as chances de recristalização do mesmo.

Em 1961, Sekiguchi e Obi foram considerados os primeiros pesquisadores a desenvolverem um sistema de DS para o aumento da solubilidade de moléculas pouco solúveis. Neste trabalho foi utilizada uréia como carreador e sulfatiazol como fármaco modelo. Após uma série de ensaios os autores concluíram que a DS aumentou significativamente a solubilidade do fármaco em água.

A manipulação da taxa de liberação do fármaco em diferentes fluidos biológicos a partir do uso de DS é conseguida através de alterações das propriedades inerentes as moléculas, entre elas: o aumento da molhabilidade da partícula, redução do seu tamanho e consequente aumento da sua área superficial, aumento do seu grau de porosidade e a conversão do estado cristalino para o estado amorfo, sendo esta última propriedade

denominada de amorfização (BOBE et al., 2011; LEUNER; DRESSMAN, 2000; VASCONCELOS; COSTA, 2007).

De acordo com Sharma e Jain (2011) diferentes métodos podem ser utilizados para o preparo de DS, entre eles destacam-se:

✓ **Método de fusão:** proposto primeiramente por Sekiguchi e Obi (1961) este método consiste na fusão do carreador e adição do fármaco sob agitação, sendo a mistura solidificada por diferentes métodos entre eles: nitrogênio líquido, banho de gelo, congelador em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a solidificação, a mistura é pulverizada e a padronização do tamanho de partícula é realizada (DAMIAN et al., 2002; GREENHALGH et al., 1999). Por outro lado, este método apresenta algumas desvantagens, como a utilização de altas temperaturas, o que o torna inviável para se trabalhar com fármacos que podem degradar nestas condições, e a possível incompatibilidade entre o fármaco e o carreador no seu estado líquido (SANTOS, 2008; VIPPAGUNTA et al., 2006).

✓ **Método de evaporação do solvente:** neste método ocorre a dissolução do fármaco e do carreador em solvente orgânico para posterior evaporação do solvente em temperatura fixa e pressão reduzida. Após a remoção do solvente, ocorre uma supersaturação do meio com a precipitação dos constituintes. A partir deste método muitos problemas obtidos com o método de fusão foram sanados, entre eles a utilização de fármacos termolábeis, assim como a utilização de polímeros que possuem altas temperaturas de fusão (polivinilpirrolidona, em torno de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$). Porém, este método apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de encontrar um solvente orgânico que solubilize ambos carreador e fármaco, o possível aparecimento de uma nova forma polimórfica e a possível presença de solventes residuais no produto sólido obtido (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; SETHIA; SQUILLANTE, 2003).

✓ **Método por amassamento:** partindo da mistura física do fármaco e do carreador, ocorre uma pequena adição de água ou mistura alcoólica até a formação de um produto pastoso. A secagem do material pode ser realizada à temperatura ambiente ou em evaporador rotatório. Devido a facilidade para transposição de escala, baixo custo e alto rendimento no processo, este método possui uma grande aplicabilidade por parte das indústrias farmacêuticas (LIMA et al., 2011).

✓ **Método de secagem por aspersão (*spray-drying*):** após solubilizar o carreador e o fármaco em solvente adequado, adiciona-se quantidade previamente determinada de um adjuvante de secagem, geralmente o dióxido de silício coloidal. A mistura é então levada ao equipamento onde rapidamente ocorrerá a evaporação do solvente, obtendo assim um material sólido com características bem definidas, entre elas: tamanho de partícula e morfologia (LIMA et al., 2011; SHARMA; JAIN, 2011).

✓ **Método de secagem por liofilização (*freeze-drying*):** esta técnica foi proposta como uma alternativa ao método de secagem por evaporação do solvente. O fármaco e o carreador são dissolvidos em um mesmo solvente, após completa solubilidade esta solução é congelada, geralmente durante 24 horas, sendo o material sólido colocado no liofilizador e por sublimação o solvente é retirado. Apresenta como desvantagem o tempo longo de secagem para alguns materiais, por exemplo, para proteínas e alimentos e o sólido obtido apresenta dificuldade de fluxo (LIMA et al., 2011; SHARMA; JAIN, 2011).

Também existem outros métodos para formação de DS como a utilização de fluido supercrítico, extrusão à quente, método eletrostático, porém menos utilizados devido ao alto grau de complexidade do processo e custo dos equipamentos (MAJERIK et al., 2007; WON et al., 2005; SETHIA; SQUILLANTE, 2002).

A partir da utilização da técnica de produção de DS um grande número de fatores podem ser melhorados, como por exemplo, aumentar a absorção de fármacos, melhorar o processo de mistura das partículas, aumentar a estabilidade de moléculas sensíveis à hidrólise, oxidação e à radiação UV, modular a liberação de fármacos em formulações controladas, reduzir os danos causados por fármacos às membranas do trato gastrointestinal, mascarar odor e sabor desagradáveis, assim como aumentar a biodisponibilidade de fármacos (FASINU et al., 2011; SHARMA; JAIN, 2011).

Na Tabela 1 pode-se observar um acelerado crescimento no registro de produtos contendo DS e fármacos de baixa solubilidade junto à órgãos regulatórios por parte das indústrias farmacêuticas, estando este crescimento vinculado aos grandes avanços atingidos no campo biofarmacêutico por parte desta técnica.

Tabela 3.1 - Produtos que utilizam a técnica de dispersão sólida aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) (Adaptado de: HUANG; DAI, 2013).

Fármaco	Polímero	Método de preparo	Ano aprovação
Griseofulvina	PEG 6000	Evaporação do solvente	1982
Nabilona	PVP	-----	1985
Tacrolimos	HPMC	-----	1990
Troglitazona	PVP	-----	1990
Itraconazol	HPMC	Secagem por aspersão	1992
Lopinavir/Ritonavir	PVPVA	Extrusão a quente	2005
Etravirina	HPMC	Secagem por aspersão	2008
Ritonavir	PVAVA	Extrusão a quente	2010
Itraconazol	HPMC	Extrusão a quente	2010
Telaprevir	HPMCAS	Secagem por aspersão	2011
Vemurafenib	HPMCAS	Co-precipitação	2011
Ivacaftor	HPMCAS	Secagem por aspersão	2012

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; PVPVA: Polivinilpirrolidona-vinilacetato; HPMCAS: Succinato acetato de hipromelose; PVP: Polivinilpirrolidona; PEG6000: Polietilenoglicol 6000.

Diferentes carreadores são utilizados no preparo de DS devido as suas propriedades que favorecem a dissolução de moléculas pouco solúveis em água, entre eles destacam-se:

✓ Polietilenoglicóis (PEGs): polímeros de óxido de etileno possuindo alto peso molecular. Apresentam alta solubilidade em água, porém esta propriedade diminui ao passo que aumenta o peso molecular. Possuem como vantagem na preparação de DS a sua boa solubilidade em muitos solventes orgânicos e necessitam de baixa temperatura para fusão (AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006). Os PEGs mais utilizados em DS são os de peso molecular entre 2000 e 6000, uma vez que PEGs com peso molecular baixo produzem formulações com consistência pegajosa dificultando a manipulação (SHAH; CHEN; CHOW, 1995).

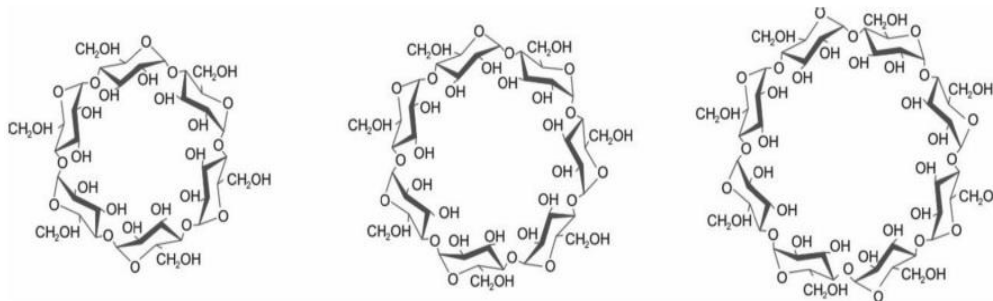
✓ Polivinilpirrolidona (PVP): polímero utilizado em grande escala para preparação de DS através do método evaporação do solvente devido a sua boa solubilidade em solventes orgânicos. Assim como os PEGs, a PVP apresenta boa solubilidade aquosa favorecendo a molhabilidade das partículas (ASO et al., 2009).

✓ Derivados de celulose: são polímeros que apresentam alto peso molecular constituídos por unidades de sacarídeos. Através da alquilação, a celulose pode ser derivada em metilcelulose (MC), hidroxipropilcelulose (HPC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), entre outras formas semissintéticas (CHOWDARY; PRASAD, 2003).

3.3.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos naturais de estrutura cônica formados por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, obtidas a partir de processos biotecnológicos envolvendo a degradação enzimática do amido de milho sob a ação da enzima glicosiltransferase (*Bacillus Macerans*). A partir da degradação do amido, formam-se 6, 7 e 8 unidades de glicose sendo estas denominadas α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, respectivamente (Figura 2) (HEISE et al., 2010; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; SZEJTLI, 1998).

Figura 3.2 - Estrutura química da α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina respectivamente (Adaptado de: VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).



Devido à orientação dos grupos funcionais que formam a ciclodextrina, a parte mais externa apresenta caráter hidrofílico, enquanto que a parte mais interna apresenta caráter mais hidrofóbico ou apolar. As ciclodextrinas naturais apresentam diferentes valores de solubilidade em água, podendo ser explicado devido às diferentes ligações de pontes de hidrogênio em sua estrutura. As ligações de hidrogênio na β -ciclodextrina formam um cinturão secundário completo ao redor da estrutura, tornando-a muito rígida, levando a uma menor solubilidade em relação as outras. Na α -ciclodextrina este cinturão não está completo, uma vez que uma das moléculas das unidades está em posição distorcida levando a formação de apenas 4 das 6 ligações de hidrogênio possíveis. No caso da γ -ciclodextrina esta apresenta

uma estrutura não coplanar, o que a deixa mais flexível e por tanto apresentando uma maior solubilidade (SZEJTLI, 1988).

A partir de modificações químicas nas estruturas primárias e secundárias nos grupos hidroxila das ciclodextrinas naturais, pode-se obter as estruturas derivadas, entre elas a metil- β -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfobutileter- β -ciclodextrina e carboximetil- β -ciclodextrina, onde estas apresentam um aumento na solubilidade aquosa, redução da toxicidade e um aumento na capacidade de inclusão de moléculas hidrofóbicas (UEKAMA; IRIE, 2004).

A partir da formação do CI entre a ciclodextrina e a molécula hóspede, este complexo tem por finalidade promover uma melhora nas propriedades físico-químicas destas moléculas, entre estas propriedades pode-se destacar: aumento na estabilidade frente às seguintes condições: radiação ultravioleta, hidrólise, oxidação e contaminação microbiana; mascarar odores e sabores desagradáveis; mascarar pigmentos ou cores; além de proteger contra a volatilização de certas substâncias. Estas alterações nas propriedades das moléculas hóspedes fazem com que as ciclodextrinas e suas estruturas derivadas tenham um grande campo de atuação nas áreas da química, agricultura, setor farmacêutico, alimentício, cosmético e higiene pessoal (SINGH; SHARMA; BANERJEE, 2002).

A aplicação industrial de ciclodextrinas até 1970 era inviabilizada devido ao baixo grau de pureza durante sua síntese e alto custo de produção. Após avanços no campo biotecnológico, a síntese das ciclodextrinas teve um grande avanço, contribuindo assim para a aplicação em nível biofarmacêutico (LOFTSSON; MÁSSON, 2001).

No setor farmacêutico, as ciclodextrinas são consideradas como excipientes e sua utilização está voltada para a obtenção de uma melhoria nas propriedades de dissolução, biodisponibilidade, redução dos efeitos adversos oriundos dos fármacos e aumentar a estabilidade de moléculas pouco solúveis em fluidos biológicos e susceptíveis à degradação (UEKAMA et al., 1983; BREWSTER et al., 1992; LOFTSSON; PETERSON, 1998; BABU; PANDIT, 1999; CWIERTNIA; HLADON; STOBIECKI, 1999; SANGWAI; VAVIA, 2013; TAUPITZ et al., 2013; TANG et al., 2015).

De acordo com Zuo e colaboradores (2000), Fathy e Sheha (2000) e Choi e colaboradores (2001) a complexação de fármacos poucos solúveis com ciclodextrinas pode ocasionar uma melhor e mais uniforme absorção destes fármacos, melhorando a eficácia dos tratamentos, uma vez que ocorre uma maior disponibilidade do fármaco livre na superfície de absorção.

De acordo com Rajewski e Stella (1996) a redução da toxicidade de algumas moléculas ativas é possível, uma vez que, a partir do complexo formado pode ocorrer o aumento da biodisponibilidade, eficácia e potência da molécula, levando há uma possível redução da dose terapêutica com uma conseqüente redução dos efeitos adversos locais e sistêmicos. As moléculas irritantes para células das mucosas e pele, uma vez complexadas, passam a não ter mais o contato direto com estas membranas. Os complexos de inclusão são capazes de reduzir a concentração local do fármaco livre abaixo da sua concentração irritante, isto é devido por parte da estrutura química do fármaco estar no interior da cavidade, sendo que a medida que ocorre a dissociação do complexo, o fármaco irá sendo absorvido pelo organismo mantendo a concentração do fármaco livre dentro dos limites aceitáveis.

Em estudo realizado por Nicolazzi e colaboradores (2002) após a complexação do ganciclovir com β -ciclodextrina, um aumento da atividade antiviral do fármaco foi observado como também uma redução da sua toxicidade.

A partir da Tabela 2 pode-se verificar inúmeros produtos comercializados mundialmente utilizando as ciclodextrinas, assim como seus derivados.

Tabela 3.2 - Formas farmacêuticas disponíveis no mercado mundial (Adaptado de Veiga; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Ciclodextrina	Fármaco (Forma farmacêutica)	Laboratório/País
α -ciclodextrina	Alprostadil (Solução IV)	Takeda/Japão
	Cefalosporina (Comprimido)	Meiji Seika/Japão
	Cetirizina (Comprimido)	IosanPharma/Alemanha
	Dexametasona (Pomada)	Fujinaga/Japão
	Nicotina (Comprimido sublingual)	Pharmacia & Upjhon/Suécia
β -ciclodextrina	Nimesulida (Supositório, granulado e comprimido)	Novartis /Itália
	Omeprazol (Comprimido)	Betapharm/Alemanha
	Piroxicam (Supositório)	Aché/Brasil
	Nitroglicerina (Comprimido)	Nihon Kayaku/Japão

	Meloxicam (Comprimido e supositório)	Medical Union Pharmaceuticals/Egypt
	Benexato HCl (Cápsula)	Teikoku/Japão
Hidroxiopropil β -ciclodextrina	Itraconazol (Solução)	Janssen/Bélgica
	Indometacina (Solução oftálmica)	Chauvin/França
	Hidrocortisona (Solução)	Actavis/Europa
	Mitomicina (Solução I.V)	Novartis/Europa
Hidroxiopropil γ -ciclodextrina	Diclofenaco (Solução oftálmica)	Ciba Vision/Suíça
Randômica metilada- β -ciclodextrina	Cloranfenicol (Solução oftálmica)	Oftalder/Portugal
	17 β -estradiol (Spray nasal)	Servier/França
	Insulina (Spray nasal)	Oftalde/Espanha

Após administração oral, o aumento da biodisponibilidade de fármacos pode ser conseguido, uma vez que as ciclodextrinas funcionam como transportadores/carreadores de moléculas hidrofóbicas até as membranas celulares lipídicas para absorção. Ao entregar as moléculas às membranas, as ciclodextrinas permanecem nos fluidos biológicos sendo metabolizadas em nível de cólon e ceco pelas bactérias da flora intestinal formando água e dióxido de carbono. O elevado tamanho das ciclodextrinas e dos seus CI formados, assim como sua superfície com característica hidrofílica, fazem com que a absorção destes carreadores seja insignificante (RAJEWSKI; STELLA, 1996).

A toxicidade das ciclodextrinas está vinculada a sua via de administração. Em administração oral de ciclodextrinas naturais e suas estruturas derivadas, mesmo em altas doses, estudos comprovam sua inocuidade (AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006; HIRAYAMA; UEKAMA, 1999; THOMPSON, 1997). Por outro lado, a utilização de ciclodextrinas em formulações parenterais é muito restrita. Após a administração, a α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e derivados alquilados apresentam nefrotoxicidade e atividade hemolítica devido a precipitação nos rins e formação de complexos com o colesterol, fosfolipídios e proteínas (DAVIS; BREWSTER, 2004).

3.4 Caracterização das DS e CI contendo moléculas de interesse

Novas tecnologias como liberação modificada, formulações lipídicas, dispersões sólidas, complexos de inclusão e sistemas baseados em nanotecnologia estão sendo desenvolvidos com a finalidade de direcionar moléculas ativas a alvos cada vez mais específicos. Junto a estas tecnologias, novos desafios em relação à estabilidade física e química e avaliação do comportamento destas novas entidades, estão em crescentes estudos para uma melhor compreensão destas tecnologias (HANCOCK, 2002).

Diferentes técnicas analíticas são utilizadas com a finalidade de complementar as informações referentes às formulações desenvolvidas, havendo assim uma melhor avaliação sobre o grau da interação entre moléculas ativas e os carreadores. Entre as principais técnicas pode-se citar: a espectroscopia no infravermelho, a difração de raios-X, métodos termoanalíticos, a microscopia eletrônica de varredura e os ensaios de dissolução.

3.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho (FT-IR) é uma técnica utilizada para evidenciar diferentes polimorfos, entre eles solvatos e hidratos, como também para verificar a natureza e extensão das interações químicas que ocorrem nas DS e CI. Após a interação entre os grupos funcionais das moléculas ativas e os grupos dos polímeros ou ciclodextrinas, a partir do espectro obtido pode-se verificar a ausência ou redução da intensidade das bandas quando comparados aos espectros dos componentes isolados (KONNO; TAYLOR, 2006; LIMA et al., 2011; VAN DEN MOOTER et al., 2001).

3.4.2 Difração de raios-X

A análise por difração de raios-X é uma técnica indispensável para a caracterização e controle de qualidade de materiais cristalinos e amorfos em suas formas isoladas ou em formulações contendo diferentes excipientes e desenvolvidas por diferentes métodos. A partir da determinação da área abaixo dos picos gerados pelo material cristalino, pode-se verificar o grau de amorfização do material cristalino e o tipo cristal da amostra (NEWMAN et al, 2008; SANTOS, 2008).

3.4.3 Métodos termoanalíticos

Entre as principais técnicas termoanalíticas para medir as alterações das propriedades físicas e químicas de uma determinada substância estão a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), a Termogravimetria (TG) e a Microscopia em Fase Quente (MFQ). No que diz respeito à análise de moléculas ativas em DS e CI, estas técnicas possuem a capacidade de caracterizar a interação entre moléculas e polímeros ou ciclodextrinas (BAIRD; TAYLOR, 2012).

A DSC é uma ferramenta muito útil na determinação do fluxo de calor em uma amostra em função da temperatura ou do tempo. A ocorrência de uma alteração na temperatura do evento, seja ele um evento endotérmico ou exotérmico, um deslocamento deste evento, assim como uma redução na sua intensidade, pode caracterizar uma interação entre a molécula ativa e os constituintes da DS ou CI (SHARMA; JAIN, 2011). A TG mede a alteração da massa do material em função da temperatura ou tempo, sendo possível monitorar as temperaturas de decomposição de substâncias orgânicas e inorgânicas (ARAÚJO et al, 2003; SANTOS, 2008). Outra técnica muito utilizada é a microscopia em fase quente que permite mostrar em tempo real as alterações ocasionadas no material sólido em função da temperatura (ZHANG et al, 2011).

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Utilizada em vários campos científicos esta técnica é útil na avaliação morfológica e estrutural dos materiais. A partir desta ferramenta é possível determinar qual foi o grau de contribuição dos diferentes métodos de preparo das DS e CI para transformação do estado cristalino da molécula ativa em um estado amorfo (DUARTE et al., 2003; PRALHAD; RAJENDRAKUMA, 2004).

3.4.5 Ensaio de dissolução

Os ensaios de dissolução *in vitro* são úteis para avaliar o tipo de liberação que diferentes formulações podem promover, sendo um passo fundamental no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos. A cinética de liberação é influenciada a partir de propriedades como solubilidade, tamanho de partícula, molhabilidade, polimorfismo e excipientes utilizados na formulação (SANTOS, 2008). A partir dos ensaios de dissolução

pode-se verificar a real contribuição dos polímeros e ciclodextrinas para o aumento da solubilidade de moléculas hidrofóbicas em diferentes fluidos (VERHEIEN et al., 2002).

3.5 Desenvolvimento e validação de método analítico

Para o controle de qualidade de matérias-primas assim como de formas farmacêuticas é de fundamental importância a utilização de metodologias analíticas adequadas. O processo de validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método analítico atenda às exigências das aplicações, assegurando a confiabilidade dos resultados e se caracteriza por ser um processo contínuo, tendo seu início no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de seu desenvolvimento (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007). No Brasil os órgãos que regulamentam o processo de validação de métodos analíticos são o INMETRO e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Os parâmetros ou figuras de mérito avaliados no processo de validação descritos na literatura são: intervalo, linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

As farmacopeias britânica (2012) e americana (2012) possuem monografias para determinação do AMH em matéria-prima, solução injetável e comprimido utilizando a potenciometria e a cromatografia a líquido de alta eficiência.

Devido a necessidade de determinar os teores e porcentagem de dissolução do AMH nas diferentes formulações previamente desenvolvidas, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de método específico para esta finalidade.

De acordo com Farmacopeia Brasileira (2010), muitas substâncias podem ser identificadas através da análise de seu espectro obtido nas diferentes regiões, ultravioleta, visível e infravermelho, em comparação com o espectro obtido utilizando a correspondente Substância Química de Referência (SQR).

As SQRs se dividem em duas classes, a classe farmacopeica, ou seja, são produzidas por órgãos regulatórios como The United States Pharmacopeia, Farmacopeia Brasileira, British Pharmacopoeia, entre outras e a classe das não farmacopeicas, que necessitam ter uma avaliação criteriosa em relação a sua elucidação estrutural e pureza, utilizando métodos analíticos adequados (FDA, 2000).

No presente trabalho, a matéria-prima (MP) AMH foi caracterizada em relação ao AMH SQR fornecido pela Farmacopeia Brasileira, utilizando a espectrofotometria no ultravioleta/visível e infravermelho e a ressonância magnética nuclear do (^1H), com a finalidade de poder utilizar esta matéria-prima para o desenvolvimento das formulações.

4.1 Substância Química de Referência e matéria-prima de cloridrato de amiodarona

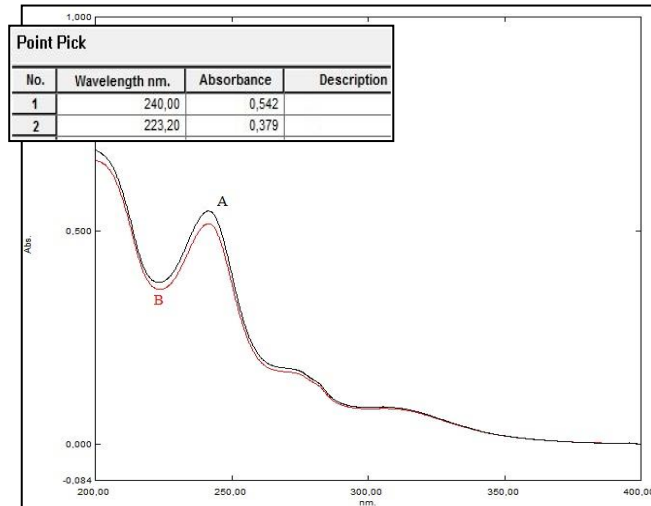
Para realização destas análises foram utilizadas as seguintes substâncias: SQR de cloridrato de amiodarona lote: 1040 e teor declarado de 99,9% doada pela Farmacopeia Brasileira e a matéria-prima lote: 10104117A e teor declarado de 99,0% obtida junto a empresa Pharmanostra[®]. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta/visível

Para esta análise foi preparada uma solução padrão contendo o cloridrato de amiodarona SQR na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando metanol como solvente. A MP foi preparada de maneira idêntica. Com auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo 1690 PC, os espectros foram obtidos no intervalo de 400 a 200 nm.

Na Figura 4.1 podemos verificar que os espectros da SQR e MP demonstram perfis similares nas condições utilizadas. Os picos máximos e mínimos de absorção foram 240,0 nm e 223,20 nm, respectivamente para ambas as substâncias.

Figura 4.1 - Espectros na região do ultravioleta/visível obtidos a partir de soluções contendo SQR de cloridrato de amiodarona (A) e MP de cloridrato de amiodarona (B), em concentração de 10 µg/mL, utilizando metanol como solvente.



A partir dos espectros acima, podemos inferir que os principais comprimentos de onda para análise do AMH, utilizando detecção ultravioleta/visível, são 240,0 nm e 223,20 nm, estando estes comprimentos de onda de acordo com a monografia oficial para o doseamento de cloridrato de amiodarona MP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

4.3 Espectrofotometria na região do infravermelho

A caracterização da MP do AMH por espectrofotometria na região do infravermelho foi realizada mediante a preparação de uma pastilha contendo 2 mg de MP e 300 mg de brometo de potássio. A pastilha contendo a SQR foi preparada de maneira idêntica. Para esta análise utilizou-se espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, Perkin-Elmer®, modelo Spectrum one.

Na Figura 4.2 podemos observar os espectros de absorção no infravermelho, no intervalo de 3600 a 500 cm⁻¹, característicos do AMH MP e SQR, estando demonstradas as principais frequências e suas respectivas atribuições na Tabela 4.1.

Figura 4.2 - Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de: SQR de cloridrato de amiodarona (A) e MP de cloridrato de amiodarona (B), preparados em pastilhas de KBr.

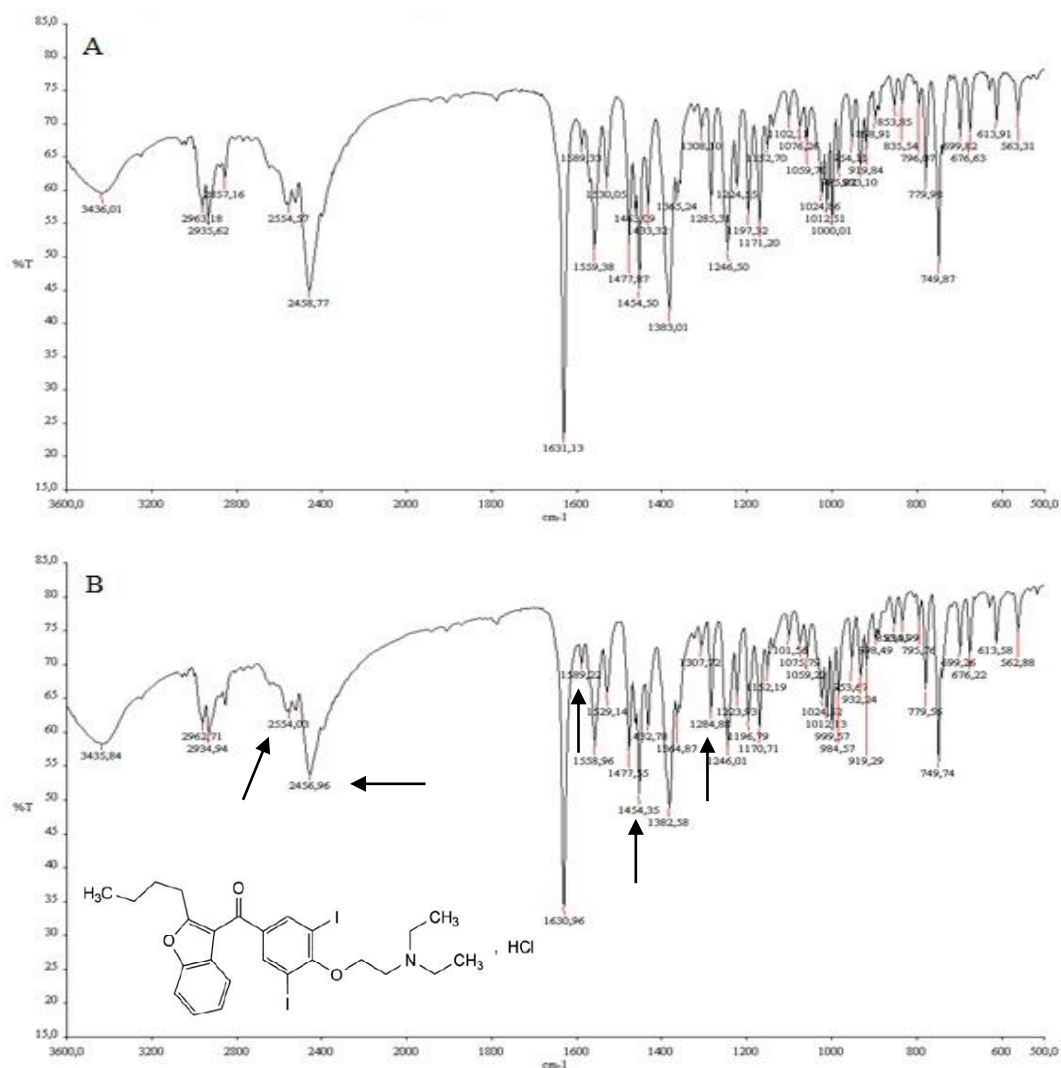


Tabela 4.1 - Frequências dos principais grupos de absorção do AMH.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
2200 - 2700	Banda fraca, referente à amina terciária
1280 - 1285	Referente à ligação cetona
1453 - 1600	Referente à ligação C = C anel aromático

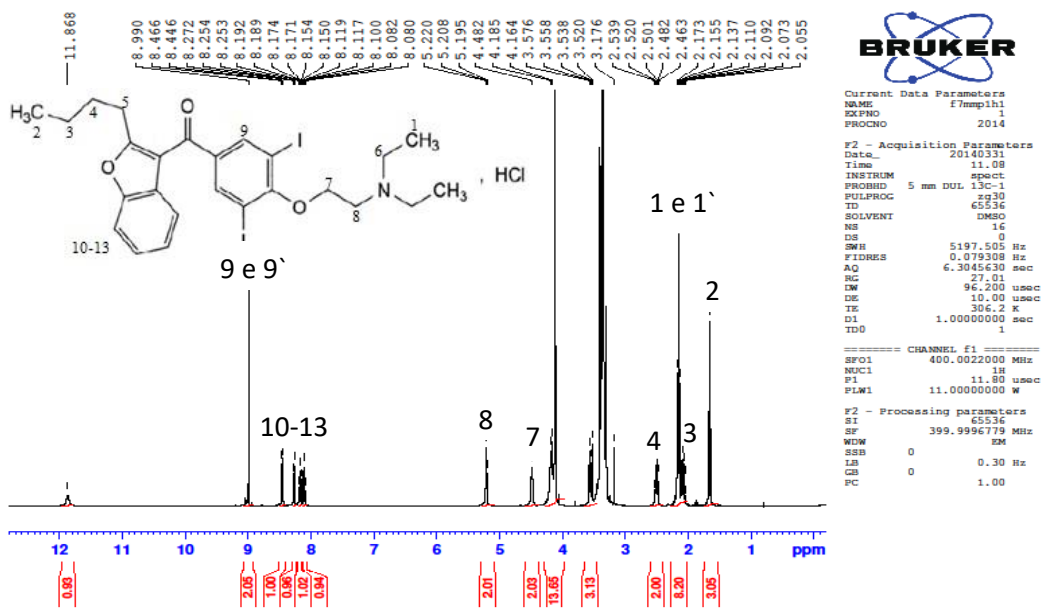
O espectro na região do infravermelho é único para cada substância, a partir da análise das frequências de determinados grupos funcionais, permite a identificação da estrutura química (SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A partir das principais frequências características dos grupos químicos do AMH SQR e também de informações citadas na literatura, podemos inferir que a MP utilizada neste estudo é a do referido fármaco (KHAN et al., 2005; PADURARU et al., 2013; RIEKES et al., 2010; SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

4.4 Ressonância Magnética Nuclear do Próton (^1H)

Esta análise foi realizada com auxílio do equipamento Bruker[®], modelo AM 4000, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) para diluição da MP. O espectro do (^1H) do AMH MP está demonstrado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Ressonância Magnética Nuclear do (^1H) para cloridrato de amiodarona MP.



A partir da avaliação dos espectros, verificaram-se sinais correspondentes aos prótons ^1H nos seguintes valores de deslocamentos químicos, conforme Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Valores referentes aos respectivos deslocamentos químicos do (^1H) e sua localização na estrutura química.

Deslocamento químico (ppm)	Grupo químico	Localização do (^1H)
2,155	2 x (CH_3)	1 e 1`
1,654	CH_3	2
2,110 – 2,037	CH_2	3
2,539 – 2,463	CH_2	4
4,482	$\text{CH}_2 - \text{O}$	7
5,220 – 5,195	$\text{CH}_2 - \text{N}$	8
8,99	2 x (CH)	9 e 9`
8,466 – 8,080	4 x (CH) aromático	10 – 13

Os valores encontrados para os deslocamentos químicos do próton (^1H) estão de acordo com as atribuições encontradas na literatura para a molécula do AMH MP (JENDRASIAK et al., 1990; RAO et al., 1994; SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

4.5 CONCLUSÃO

A partir dos ensaios de caracterização realizados utilizando o AMH SQR e MP, pode-se confirmar que a MP utilizada neste trabalho se trata do fármaco de interesse, possibilitando assim sua utilização para o preparo das formulações.

Capítulo 5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CLORIDRATO DE AMIODARONA EM DISPERSÃO SÓLIDA E COMPLEXO DE INCLUSÃO

5.1 Preparo das soluções padrão contendo AMH SQR, amostra DS e amostra placebo da DS e CI.

Os seguintes procedimentos foram utilizados para a determinação do fármaco na dispersão sólida desenvolvida através da mistura física do PEG 1500 e o AMH.

Para o preparo da solução contendo AMH SQR, pesou-se o equivalente a 10 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume utilizando metanol. A seguir, alíquotas de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,1 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com solução de água:metanol (1:1) como diluente. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Para o preparo das soluções amostras da DS, pesaram-se analiticamente o equivalente a 10 mg do AMH MP e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol. Posteriormente, uma alíquota de 1,2 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com diluente (120 µg/mL).

Para o preparo das amostras placebo, pesaram-se analiticamente os diferentes polímeros e ciclodextrinas, referente a 10 mg do AMH e procedeu-se conforme preparo da solução amostra.

Cabe ressaltar que os resultados aqui obtidos no desenvolvimento do método analítico são referentes à dispersão sólida contendo PEG 1500 e o AMH preparadas a partir do método de mistura física.

5.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Baseando-se em metodologias oficiais e em trabalhos publicados por alguns autores, testaram-se diferentes tipos de fase móvel e proporções entre seus constituintes, colunas contendo diferentes tamanhos e fases estacionárias, assim como diferentes volumes de injeção das soluções, temperaturas do forno e vazão da fase móvel (ELHASI; ASTANEH; LAVASANIFAR, 2007; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2012; KHAN et al., 2005; LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2009; MUHAMMAD et al., 2008).

Através da avaliação dos parâmetros cromatográficos, foi desenvolvido um método analítico quantitativo para o AMH em DS e CI, utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Condições cromatográficas para a quantificação do AMH em DS e CI por CLAE.

Parâmetro cromatográfico	Descrição
Fase móvel	Metanol:Acetonitrila:Tampão fosfato pH 2,2 (68:15:17)
Diluyente	Água:Metanol (1:1)
Vazão da fase móvel	1,0 mL/minuto
Temperatura	25 °C
Detecção	Ultravioleta ($\lambda = 240$ nm)
Volume de injeção	10 μ L
Coluna	Phenomenex [®] Luna C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μ m)

5.3 Preparo da fase móvel

5.3.1 Tampão fosfato de sódio pH 2,2

Pesou-se 1,38 g de fosfato de sódio monobásico anidro e com auxílio de 800 mL de água ultrapura o mesmo foi dissolvido. Após completa dissolução, ajustou-se o pH para 2,2 com ácido fosfórico e diluiu-se para 1000 mL com água ultrapura.

A solução foi filtrada através de membrana de celulose regenerada 0,45 μ m e 47 mm de diâmetro com auxílio de sistema de vácuo e desgaseificada com auxílio de banho de ultrassom durante 10 minutos.

5.3.2 Metanol e acetonitrila grau cromatográfico

Com auxílio de membrana de celulose regenerada 0,45 μ m, 47 mm de diâmetro e sistema de vácuo, o metanol e a acetonitrila foram filtrados e desgaseificados em banho de ultrassom durante 10 minutos.

5.4 Validação do método analítico para quantificação do AMH.

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: intervalo, linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

5.4.1 Intervalo e linearidade

Após a avaliação dos cromatogramas obtidos a partir do item 5.1, foi determinada a curva padrão e seu intervalo linear. A curva padrão foi realizada em triplicata e, com a área absoluta média obtida, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco (μ g/mL). A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas

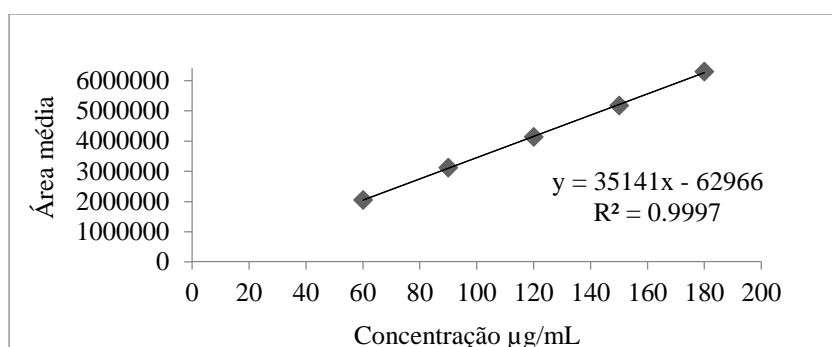
através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA). As áreas obtidas na avaliação da curva e a respectiva equação da reta estão demonstradas na Tabela 5.2 e Figura 5.1.

Tabela 5.2 - Valores das áreas obtidas a partir da curva padrão do AMH SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área*	Média das áreas \pm epm	DPR (%)
60,0	2076013	$2050999 \pm 13545,40$	1,14
	2047499		
	2029485		
90,0	3113862	$3119177 \pm 4142,40$	0,23
	3116331		
	3127338		
120,0	4099581	$4132558 \pm 16578,01$	0,69
	4146078		
	4152016		
150,0	5151850	$5170768 \pm 12575,38$	0,42
	5194579		
	5165876		
180,0	6339693	$6296382 \pm 36221,42$	1,00
	6325015		
	6224439		

* Resultado de três ensaios; e.p.m. - erro padrão da média.

Figura 5.1 - Representação gráfica da curva analítica para AMH SQR



A partir da análise de variância (ANOVA) dos resultados da curva média padrão, Tabela 5.3, a curva padrão não apresentou desvio de linearidade e apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$). Estes resultados, juntamente com o coeficiente de determinação ($r^2 = 0,999$), demonstram que esta curva padrão, na faixa de concentração de 60,0 a 180,0 $\mu\text{g/mL}$, pode ser utilizada para a interpolação dos valores experimentais, visando à determinação quantitativa desta substância.

Tabela 5.3 – Análise de variância da curva padrão de AMH SQR.

FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F.C	FT
Entre amostras	4	33352654486808	8338163621702	7143.17	3.48
Regressão linear	1	33342393660049	33342393660049	28563.90	4.96
Desvio de linearidade	3	10260826758.8	3420275586	2.9301	3.71
Resíduo	10	11672912714	1167291271		
Total	14	3.33643E+13			

5.4.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de precisão intermediária e repetibilidade.

A repetibilidade do método foi avaliada através do doseamento do AMH MP nas DS, em três concentrações diferentes, por um analista em um único dia, conforme descrito a seguir:

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 10 mg do AMH e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol. Alíquotas de 0,6; 1,2; 1,8 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se os volumes com diluente, obtendo as respectivas concentrações de 60, 120 e 180 µg/mL

Os valores experimentais obtidos para determinação da repetibilidade do método desenvolvido encontram-se descritos na Tabela 5.4. O DPR médio para os teores, neste ensaio foi de 0,96%, estando assim abaixo do limite máximo preconizado de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 5.4 - Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade do AMH em DS.

Concentração da amostra (µg/mL)	Área	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
60	2000304	97,86	98,21	0,72
	2025076	99,03		
	1998059	97,75		
120	4088641	98,45	98,49	1,16
	4139718	99,66		
	4043055	97,37		
180	6130693	97,92	97,27	0,69
	6093038	97,32		
	6045658	96,57		
Média do ensaio (%) ± DP		97,99 ± 0,93		
DPR médio do ensaio (%)		0,96		

A precisão intermediária foi obtida através da determinação do AMH, na concentração de 120 µg/mL, em três dias diferentes, por dois analistas diferentes. As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 10 mg do AMH e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol. Alíquotas de 1,2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com diluente (120 µg/mL).

As soluções foram injetadas em triplicata nas condições cromatográficas estabelecidas. A quantidade do AMH presente nas DS foi determinada através da equação da reta, obtida a partir da curva padrão.

Os valores experimentais obtidos para determinação da precisão intermediária do método desenvolvido encontram-se descritos na Tabela 5.5. O DPR médio entre os analistas, nesta avaliação, foi de 0,24%, estando assim abaixo do limite preconizado de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 5.5 – Valores experimentais obtidos para a avaliação de precisão intermediária do AMH em DS.

Dia	n	Analista 1 teor da amostra (%)	Analista 2 teor da amostra (%)
1	1	99,84	99,89
	2	101,04	97,53
	3	97,68	97,66
2	1	100,38	99,94
	2	97,43	101,13
	3	99,94	97,75
3	1	99,20	101,54
	2	100,99	99,89
	3	97,66	101,93
Média (%) ± DP		99,35 ± 0,3026	99,70 ± 0,1816
DPR dos analistas		0,3	0,18
Teor médio do ensaio (%)		99,53	
DPR do ensaio		0,24	

A partir dos valores de DPR obtidos, verifica-se que o método desenvolvido apresenta uma adequada repetibilidade e precisão para a finalidade pretendida.

5.4.3 Exatidão

A exatidão de um método representa a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003).

A exatidão foi determinada através da adição de quantidade conhecida da SQR na DS, em quatro diferentes níveis de concentração, conforme descrito a seguir:

Soluções do AMH SQR e amostra foram preparadas ambas na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Transferiu-se 0,6 mL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados A, R1, R2, R3 e R4. Adicionaram-se alíquotas de 0,2; 0,6; 1,0 e 1,2 mL da solução SQR nos balões R1, R2, R3 e R4. Completou-se o volume com diluente, a fim de se obter as concentrações finais teóricas de 60, 80, 120, 160 e 180 µg/mL.

Os resultados obtidos no ensaio demonstram que o método proposto é exato, uma vez que, as concentrações determinadas estão próximas aos valores verdadeiros. O valor médio da porcentagem de recuperação do AMH SQR foi de 99,86%, apresentando valor inferior de 98,91% e superior de 100,8%. O valor recomendado para os diferentes níveis de concentração deve ser de 98,0% a 102,0% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

5.4.4 Robustez

A robustez do método analítico mede a capacidade que o mesmo apresenta em resistir a pequenas variações em seus parâmetros, indicando assim sua confiança durante sua utilização (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

Para o desenvolvimento do método as seguintes variações foram propostas, conforme Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Variações propostas no método original.

Parâmetro	Método proposto	Alteração realizada	
Fase móvel	Metanol:Acetonitrila :Tampão fosfato pH 2,2 (68:15:17)	Metanol:Acetonitrila: Tampão fosfato pH 2,2 (70:15:15)	Metanol:Acetonitrila: Tampão fosfato pH 2,2 (65:15:20)
Vazão (mL/min)	1,0	0,8	1,2
Temp. no forno (°C)	25	20	30

Para verificar se as variações propostas nos parâmetros originais do método foram capazes de alterar a análise quantitativa do AMH em DS, foram preparadas soluções, conforme item 5.1 do AMH SQR e AMH MP, ambas na concentração de 120 µg/mL. Para

cada variação proposta, as amostras foram injetadas em triplicata, sendo o teor do AMH em DS determinado a partir da área obtida.

Após a realização dos ensaios, verificou-se que as condições propostas não foram capazes de interferir na quantificação do fármaco, uma vez que os valores obtidos estão muito próximos dos teores encontrados no ensaio de precisão. Os resultados e seus respectivos tempos de retenção podem ser observados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Resultados obtidos no ensaio de robustez do método.

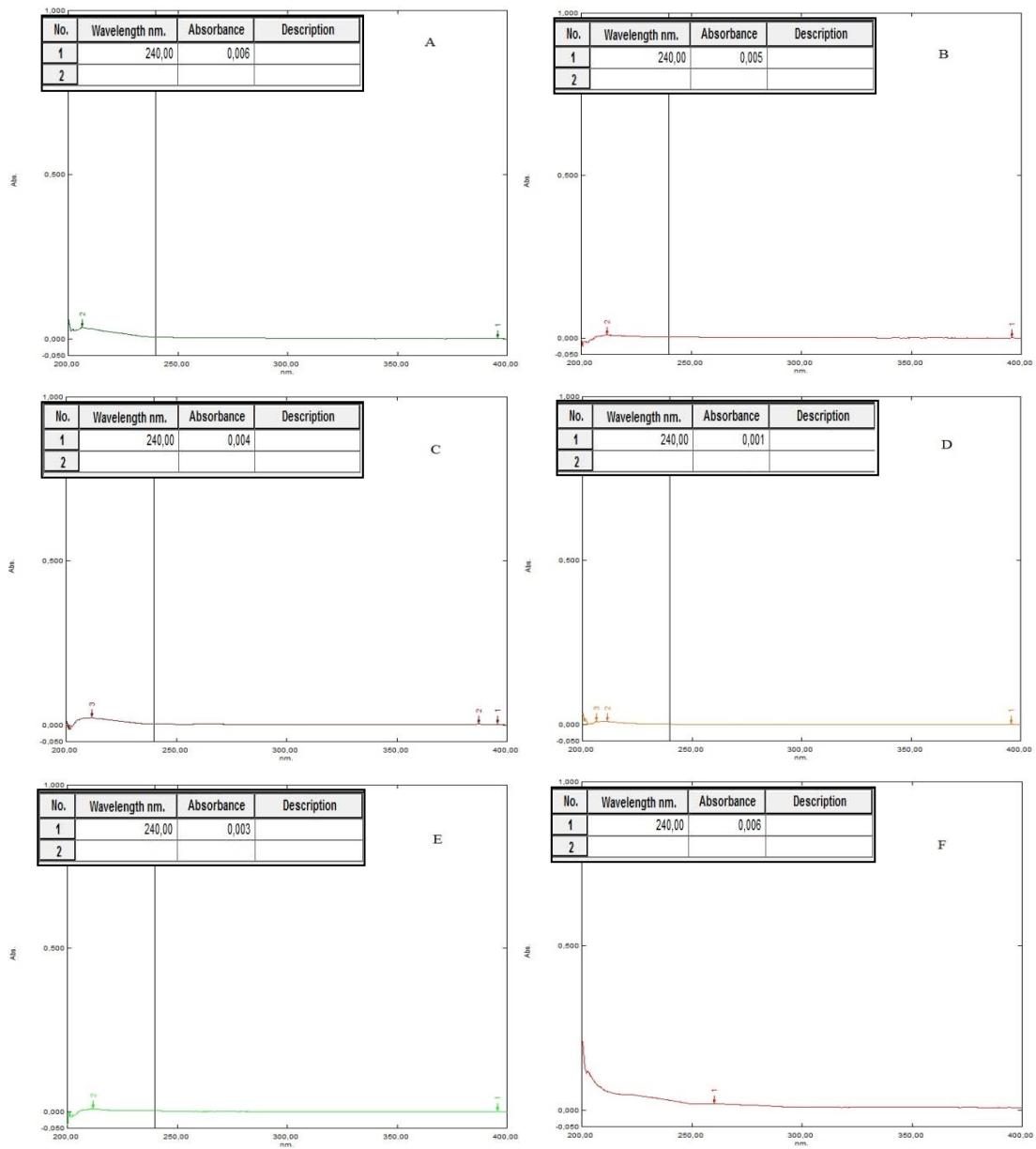
Parâmetro	Resultado obtido (%)	
Fase móvel	A = 98,31% Tr: 6,8 minutos	B = 99,53% Tr: 4,5 minutos
Vazão (mL/min)	C = 99,03% Tr: 7,3 minutos	D = 98,79% Tr: 3,7 minutos
Temperatura no forno (°C)	E = 99,64%	F = 99,72%

A = Metanol:Acetonitrila:Tampão fosfato pH 2,2 (70:15:15); B = Metanol:Acetonitrila:Tampão fosfato pH 2,2 (65:15:20); C = 0,8 mL/minutos; D = 1,2 mL/minutos; E = 20 °C; F = 30 °C; Tr: Tempo de retenção para o AMH; Tempo de retenção do AMH na condição desenvolvida: 5,2 minutos

5.4.5 Especificidade

A especificidade do método analítico é a capacidade que o mesmo possui de analisar a substância de interesse mesmo quando esta se encontra em presença de outros componentes, tais como excipientes, outros ingredientes ativos, impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). De acordo com a Figura 5.2 pode-se observar os espectros obtidos com os polímeros e ciclodextrinas.

Figura 5.2 - Espectros correspondentes a: PEG 1500 (A), PEG 4000 (B), PEG 6000 (C), Metil- β -ciclodextrina (D), 2-HP- β -ciclodextrina (E) e β -ciclodextrina (F).



Após a preparação das amostras placebo conforme item 5.1, verificou-se que nenhum dos diferentes polímeros assim como as diferentes ciclodextrinas foram capazes de absorver radiação ultravioleta no mesmo comprimento de onda de máxima absorção do AMH (240 nm), não interferindo assim na análise quantitativa do fármaco. Deste modo, conclui-se que o método é específico para determinação do AMH quando formulado em DS e CI.

5.5 Quantificação do AMH nas diferentes formulações a partir do método cromatográfico desenvolvido.

Para avaliação do teor do AMH nas dispersões sólidas e complexos de inclusão os procedimentos a seguir foram adotados:

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 10 mg do AMH e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol. Alíquotas de 1,2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com diluente (120 µg/mL).

O procedimento foi realizado em triplicata, sendo as amostras injetadas nas condições cromatográficas estabelecidas. A quantidade do AMH presente nas diferentes formulações foi determinada através da equação da reta, obtida a partir da curva padrão média.

Os resultados quantitativos do AMH nas dispersões sólidas e complexos de inclusão estão demonstrados nas tabelas 5.8 e 5.9 respectivamente.

Tabela 5.8 - Resultados obtidos a partir do doseamento do AMH nas dispersões sólidas preparadas a partir de diferentes métodos.

		Teor de AMH encontrado nas formulações (%)		
		Mistura física ^a	Amassamento ^a	Fusão ^a
Dispersões sólidas	PEG 1500	99,52 ± 1,21	97,98 ± 1,93	101,33 ± 1,03
	PEG 4000	97,80 ± 1,07	99,10 ± 0,58	99,65 ± 1,57
	PEG 6000	98,67 ± 0,87	97,56 ± 0,46	98,71 ± 1,93

^aValores médios encontrados.

Tabela 5.9 - Resultados obtidos a partir do doseamento do AMH nos complexos de inclusão preparadas a partir de diferentes métodos.

		Teor de AMH encontrado nas formulações (%)			
		Mistura física ^a	Coevaporação ^a	Liofilização ^a	Secagem por aspersão ^a
Complexos de inclusão	β-ciclodextrina	98,89	101,91 ± 0,34	97,01 ± 0,98	98,31 ± 1,74
	Metil-β-ciclodextrina	99,02	99,67 ± 1,66	98,14 ± 0,51	99,48 ± 0,67
	HP-β-ciclodextrina	99,27	98,20 ± 1,21	97,40 ± 1,08	98,54 ± 1,33

^aValores médios encontrados.

De acordo com os resultados obtidos todas as dispersões sólidas e os complexos de inclusão apresentaram teores médios do AMH entre 97,56 e 101,33% e 97,01 e 101,91% respectivamente. Os resultados demonstram que não houve perda do fármaco nas misturas durante os processos utilizados, assim como uma homogeneidade do fármaco nas formulações foi obtida, resultado este importante para um futuro desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, indicando assim que os métodos de preparo são viáveis e seguros para o desenvolvimento das formulações.

5.6 CONCLUSÃO

O método desenvolvido utilizando a CLAE é um método linear, específico, preciso, exato e robusto para a determinação quantitativa do AMH em formulações contendo DS e CI, sendo este método utilizado no decorrer do trabalho para avaliação dos parâmetros de teor e taxa de dissolução do AMH.

A solubilidade de uma molécula é um parâmetro importante para sua absorção e biodisponibilidade oral, uma vez que o fármaco deve estar em solução para ser absorvido pelos principais sítios de absorção. O número de candidatos a fármacos possuindo pouca solubilidade em fluidos fisiológicos tem aumentado nos últimos anos, tornando o desenvolvimento de formulações para administração oral um frequente desafio para os pesquisadores (MEYER, 1998; MARTIN, 2003).

Entre as principais técnicas utilizadas para o aumento da solubilidade podemos destacar: a micronização, formação de cocristais, modificações químicas, solubilização micelar e o ajuste de pH de formulações líquidas. A formação de dispersão sólida e complexos de inclusão estão entre estas técnicas (BITTNER; MOUNTFIELD, 2002; BEVAN; LLOYD, 2000; KERNS, 2001).

O primeiro artigo produzido a partir desta tese trata da formação de dispersões sólidas utilizando polietilenoglicóis 1500, 4000 e 6000 como polímeros hidrofílicos. Para formação das dispersões foram utilizados os métodos de amassamento, fusão e mistura física. A partir das formulações resultados significativos foram encontrados no que diz respeito ao aumento da solubilidade do fármaco alvo desta tese.

Posteriormente, foram produzidos complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas através dos métodos de coevaporação do solvente, mistura física, *spray-drying* e *freeze-drying*. Após a formação dos complexos, constatou-se a redução da cristalinidade característica do cloridrato de amiodarona e uma interação intermolecular entre as ciclodextrinas e o fármaco. Para todos os meios testados uma maior taxa de dissolução foi obtida em relação ao fármaco puro.

Após a escolha do carreador e do melhor processo de produção que apresentou maior influência na solubilidade do fármaco, foram produzidos, por compressão direta comprimidos de liberação imediata contendo 10 mg de cloridrato de amiodarona.

Utilizando a metil- β -ciclodextrina e o processo de *spray-drying*, complexos de inclusão foram produzidos e caracterizados. A partir dos pós obtidos, foram produzidas três diferentes formulações para compressão. Após análise dos perfis de dissolução utilizando diferentes meios fisiológicos, os comprimidos apresentaram uma liberação do tipo imediata e superior quando comparados ao fármaco puro, demonstrando assim, a grande influência da ciclodextrina e do processo de fabricação do complexo de inclusão para o aumento da solubilidade de moléculas pouco solúveis.

Capítulo 6. ARTIGO 1

Artigo publicado no periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*
(Vol.51, n.4, 2015)

Amiodarone hydrochloride: enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion
technique

Amiodarone hydrochloride: enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion technique

**Alexandre Machado Rubim*¹, Jaqueline Bandeira Rubenick², Eduarda Gregolin²,
Luciane Varini Laporta¹, Rosimar Leitenberg², Clarice Madalena Bueno Rolim¹**

¹*Department of Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil,*

²*Laboratory of Control of Drug Quality, Franciscan University Center, Santa Maria, RS,
Brazil*

***Correspondence:**

A. M. Rubim

Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos

Departamento de Farmácia

Universidade Federal de Santa Maria

97105-900 - Santa Maria - RS, Brazil

E-mail: alexandre.rubim01@gmail.com; clarice.rolim@gmail.com

Amiodarone HCl is an antiarrhythmic agent which has low aqueous solubility and presents absorption problems. This study aimed to develop inclusion complexes containing hydrophilic carriers PEG 1500, 4000 and 6000 by fusion and kneading methods in order to evaluate the increase in solubility and dissolution rate of amiodarone HCl. The solid dispersion and physical mixtures were characterized by X-ray diffraction, FT-IR spectra, water solubility and dissolution profiles. Both methods and carriers increased of solubility of drug however the PEG 6000 enhanced the drug solubility in solid dispersion better than other carriers. Different media were evaluated for the solubility study, including distilled water, acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8 at 37 °C. Based on the evaluation of the results obtained in the study phase solubility carriers PEG 4000 and PEG 6000 were selected for the preparation of the physical mixture and solid dispersion. All formulations were prepared at drug-carrier ratios of 1:1 to 1:10 (w/w). The results of *in vitro* release studies indicated that the solid dispersion technique by fusion method in proportion of 1:10 (w/w) increased significantly the dissolution rate of drug. X-ray diffraction studies showed reduced drug crystallinity in the solid dispersions. FT-IR demonstrated interactions between the drug and polymers.

Uniterms: Amiodarone HCl. Hydrophilic polymer. Dissolution profile. Solid dispersion.

Cloridrato de amiodarona é um agente antiarrítmico que possui baixa solubilidade aquosa e apresenta problemas de absorção. Este estudo teve como objetivo desenvolver complexos de inclusão contendo carreadores hidrofílicos PEG 1500, 4000 e 6000 através dos métodos de fusão e amassamento para avaliar o aumento da solubilidade e taxa de dissolução do cloridrato de amiodarona. As dispersões sólidas e misturas físicas foram caracterizadas por difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, solubilidade em água e perfis de dissolução. Ambos os métodos e carreadores aumentaram a solubilidade do fármaco, no entanto o PEG 6000 aumentou a solubilidade do fármaco na dispersão sólida mais que os outros carreadores. Diferentes meios foram avaliados para o estudo de solubilidade, incluindo água destilada, tampão ácido pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. Com base na avaliação dos resultados obtidos no estudo de solubilidade de fases, os carreadores PEG 4000 e PEG 6000 foram selecionados para a preparação das misturas físicas e dispersões sólidas. Todas as formulações foram preparadas nas razões fármaco-carreador de 1:1 a 1:10 (p/p). Os resultados de liberação *in vitro* que a técnica de dispersão sólida pelo método de fusão na proporção 1:10 (p/p) aumentou significativamente a taxa de dissolução do fármaco. Estudos de difração de raios-X mostrou redução da cristalinidade do fármaco na dispersão sólida. Análise por espectroscopia no infravermelho demonstrou interações entre o fármaco e o carreador.

Unitermos: Cloridrato de Amiodarona. Polímero hidrofílico. Perfil de dissolução. Dispersão sólida.

INTRODUCTION

Oral administration is the most common route for therapy of many diseases, however poorly soluble drugs have low bioavailability thereby decreasing treatment efficacy. For any active substance aqueous solubility and intestinal permeability are key determinants that govern dissolution, absorption and oral bioavailability (Leuner, Dressman, 2000; Mutalik *et al.*, 2008; Zisiou *et al.*, 2005).

For certain drugs such as griseofulvin, indomethacin, chloramphenicol, carbamazepine, phenytoin, digoxin aqueous solubility is a challenge to researchers and the pharmaceutical industries (Badry, Fetih, Fathy, 2009; Meshal *et al.*, 1993). Hence, different studies are performed to increase the rate of dissolution of poorly water soluble drugs, to

increase their effectiveness and simultaneously reduce their doses hence their toxic effects (Patel *et al.*, 2008).

Generally the techniques of chemistry modification, micronization, micellar solubilization, pH adjustment, use of solid dispersion, and formation of the inclusion compounds such as cyclodextrin and derivatives, are utilized for enhanced solubility of drugs (Alves *et al.*, 2014; Chow *et al.*, 1995; Flego, Lovrecich, Rubessa, 1988; Habib, Attia, 1985; Jablan, Szalontai, Jug, 2012; Vemula, Lagishetty, Lingala, 2010)

The solid dispersion technique was introduced in the early 1970s. Solid dispersion is one of the most successful strategies to improve the release of poorly soluble drug. This can be defined as dispersion of poorly water soluble drugs in hydrophilic carriers (Vasconcelos, Sarmiento, Costa, 2007). The basic procedures used to prepare the solid dispersion are the fusion method, solvent evaporation method and hot extrusion method (Chiou, Riegelman, 1971; Modi, Tayade, 2006; Sammour *et al.*, 2006). Drug solubility is improved based on three different mechanisms: the increased wettability of the drug, the reduction of particle size and increased surface area, and the conversion of the crystalline state to the more soluble amorphous state (Lloyd, Craig, Smith, 1999; Taylor, Zografi, 1997; Waard *et al.*, 2008).

AMH, chemically known as (2-Butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl]methanone hydrochloride, is a benzofuranic derivative, used for the treatment of both supraventricular and ventricular arrhythmias. AMH is a white or almost white, crystalline powder and is very slightly soluble in water (0.2 – 0.5 mg/mL), freely soluble in methylene chloride, soluble in methanol, sparingly soluble in ethanol (96 per cent) (British Pharmacopoeia, 2012; Eghrary *et al.*, 2012; Riekes, *et al.*, 2010; The Index Merck, 2001; The United States Pharmacopeia, 2012). AMH is classified as a class II drug based on the Biopharmaceutical Classification System (BCS), due to its low water solubility and high permeability (Riekes, *et al.*, 2010).

Few studies were shown in the literature about the improvement of aqueous solubility and absorption of AMH including Elhasi, Astaneh, Lavasanifar, 2007; Jouyban, Eghrary, Zarghami, 2013; Martín-Algarra *et al.*, 1995; Paduraru, *et al.*, 2013; Riekes, *et al.*, 2010.

The present study aimed to develop inclusion complexes containing hydrophilic carriers in order to evaluate increased AMH solubility and dissolution rate. The physicochemical characteristics and dissolution were assessed using Fourier transform infrared, X-ray powder diffraction and *in vitro* dissolution profiles.

MATERIAL AND METHODS

Material

AMH with purity greater than 99.9% (standard substance) was obtained from Brazilian Pharmacopeia, batch 1040. The raw material AMH batch: 10104117A (purity > 99.0%) was purchased from Pharmanostra[®] (Brazil). Polyethylene glycol 1500 (PEG 1500), 4000 (PEG 4000) e 6000 (PEG 6000) was purchased from Delaware[®] (Brazil). Water was prepared by ultra-pure water system (Milli-Q[®]). Other reagents and solvents used were of analytical grade.

Methods

Determination of AMH content

The AMH was quantified using the previously validated LC-method, employing a Shimadzu[®] (Kyoto, Japan), equipped with an LC-20AT pump, SIL-20A ht auto sampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A PDA detector, CBM-20A system controller, and LC solution software. The analyses were conducted using reverse phase Phenomenex[®] Luna C₁₈ column (150 x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was composed of methanol:acetonitrile:buffer phosphate pH 2.2 (68:15:17), with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, at 25.0 °C and a volume of 10 μ L was injected.

Solubility studies

This study was carried out to select a suitable dissolution medium for the *in vitro* drug release. An excess amount of AMH was transferred to an erlenmeyer, containing 10 mL of different solutions (distilled water, acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8). Flasks were covered to avoid solvent loss and then shaken at 120 rpm in an orbital shaking incubator (Novatecnica[®], NT712) for 24 hours at 37 °C \pm 0.5 °C.

]

Phase solubility study

The phase solubility study was performed according to the method reported by Higuchi and Connors (1965). An excess amount of AMH was transferred to an Erlenmeyer flask containing 10 mL aqueous solutions with increasing concentrations of each carrier (i.e., 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, and 1.5%) (w/v). Flasks were covered to avoid solvent loss and then shaken at 120 rpm in an orbital shaking incubator (Novatecnica[®], NT712) for 24 hours at 25 and 37 °C. After equilibrium, samples were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes and filtered through a 0.45 µm membrane filter and analyzed for drug content using HPLC method. For determination of spontaneity of the dissolution process, the values of Gibbs free energy (ΔG_{tr}) were calculated for each carrier in different temperatures in accordance with equation 1:

$$\Delta G_{tr} = -2.303RT \log \frac{S_c}{S_o} \quad (1)$$

Where: R is the universal gases constant ($8.314472 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T is the temperature in Kelvin, S_c is the solubility of the drug at a certain concentration of the carrier and S_o is the concentration of AMH in water in the absence of carrier, both in µg/mL

Preparation of solid dispersions and physical mixture

For the preparation of the physical mixture and solid dispersions using different methods, initially the drug and carrier were sieved at 355 µm mesh to standardize particle size and for storage in a desiccator.

Physical mixtures (PM)

The PM of drug with carrier was prepared by mixing proportions 1:1 and 1:10 (w/w), respectively in a mortar for 10 min.

Solid dispersion by kneading method (SDKN)

The SDKN of drug with carrier was started from the PM, with subsequent kneading using water in a sufficient quantity to maintain a slightly moist consistency. After 20 min of kneading, the mixture was left at room temperature for 24 hours and the product obtained was powdered in a mortar and passed through a 335 μm mesh.

Solid dispersion by fusion method (SDFM)

The SDFM of drug in carrier was prepared as follows. The drug was added to the molten carrier at 80 °C with continuous stirring until the formation of a homogeneous dispersion. The dispersion was placed in a freezer at -80 °C for 24 hours. After this period the product was ground using a mortar and passed through a 355 μm mesh.

Characterization of the solid dispersions

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The samples were weighed about 5 mg and they were homogenized with 300 mg of potassium bromide using a mortar. The samples were then compressed using a hydraulic press to obtain a translucent tablet. The samples were scanned from (4000 to 450 cm^{-1}) using a Perkin Elmer® spectrometer.

X-ray powder diffraction analysis (XRD)

The diffraction patterns of samples were obtained using an X-ray diffractometer (Rigaku®, Miniflex300), using Cu as an anode material, operated at a voltage of 10 mA, 30 kV, monochromatic radiation ($\lambda = 1.54051 \text{ \AA}$). The samples were analyzed from 5° to 60° in the range of 2θ , in increments of 0.03 °/s.

In vitro dissolution profiles

Studies of dissolution of pure AMH, PMs and SDs with different carriers were performed in triplicate using dissolution test equipment, USP Apparatus 2 at 50 rpm with 900 mL dissolution medium (i.e. water, hydrochloric acid pH 1.2, buffer acetate pH 4.5 and buffer phosphate 6.8) at 37 °C \pm 0.5 °C. Samples of pure drug, PMs and SDs equivalent to 100 mg of

the drug were utilized in evaluation. Dissolution studies were conducted for 90 minutes, and 10 mL were collected at 5, 10, 15, 30, 60 and 90 min intervals and replaced with an equal volume of fresh medium to maintain a constant total volume. The percentage of drug dissolved was determined using the HPLC method.

RESULTS AND DISCUSSION

Solubility studies

The effect of pH on AMH solubility was observed. This drug presented poorly solubility in pH similar to the intestine, whereas in more acidic pH the values were higher. The results found are shown in Table I.

TABLE I – Solubility values of AMH in different dissolution media at 37 °C ± 0.5 °C

Dissolution media	% drug solubility ^a
Water distilled pH 5.5	14.20 ± 0.5330
Acid buffer pH 1.2	0.1395 ± 0.018
Acetate buffer pH 4.5	1.154 ± 0.2152
Phosphate buffer pH 6.8	0.0409 ± 0.0167

^a values are expressed as mean ± SD, *n* = 4.

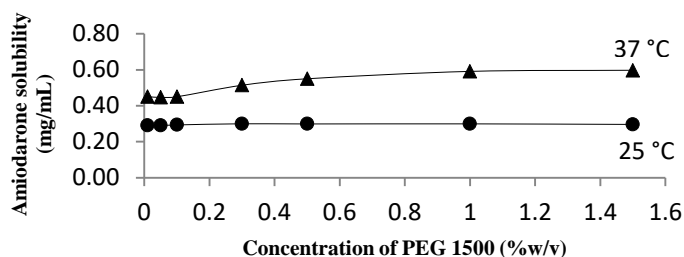
After evaluation of this study it became clear that in media with a pH equal to or greater than pKa the drug (6.56 ± 0.06) the molecule remains in a unionized form reducing the solubility (Boury *et al.*, 2001; The Index Merck, 2001). According to results, an increase of drug solubility in media with pH between 4.5 and 5.5 became clear. For this reason these media were selected for evaluation of AMH solubility in solid dispersion. The high solubility of the drug in water when compared with the other media may be due to the presence of anions dissolved in buffer solutions, insoluble complexes being formed with molecules of the drug. (Avdeef, 2007; Boury *et al.*, 2001; Ravin, Shami, Rattie, 1975).

Phases solubility study

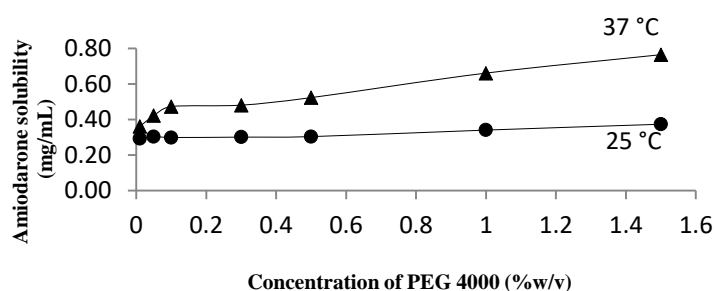
The phase solubility curves of pure AMH in the presence of PEG 1500, 4000 and 6000 at 25 and 37 °C are shown in Figure 1. The apparent solubility of AMH increased with increasing temperature and carrier concentrations. Using the highest carrier concentration, the

aqueous solubility increased approximately 1.07, 1.31 and 5.72-fold for PEG 1500, 4000 and 6000, respectively at 25 °C and 1.25, 1.58 and 3.51-fold, respectively at 37 °C compared to pure drug. The solubility found this study for AMH in water at 25 and 37 °C was 0.2815 and 0.4808 mg/mL, respectively, very similar to that reported in the literature (Amidon *et al.*, 1995; Eghrany *et al.*, 2012).

(A)



(B)



(C)

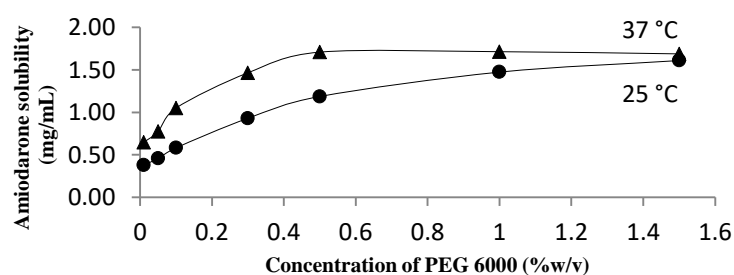


FIGURE 1 – Phase solubility curves of AMH in aqueous solutions of (A) PEG 1500, (B) PEG 4000 and (C) PEG 6000 at 25 and 37 °C \pm 0.5 °C (n = 3).

Table II shows the slopes of the curves. The higher slope value is associated with enhancement of the solubility. The Gibbs free energy (ΔG_{tr}) relating to the spontaneity of the process of drug dissolution in aqueous solutions containing different carriers is shown in Table II. Generally, the increase in solubility is directly associated with values of $\Delta G_{tr} < 0$ being proportional to the increased carrier concentration (Patel *et al.*, 2008).

TABLE II – Parameters for phase solubility studies of AMH obtained with different carriers at 25 and 37 °C \pm 0.5 °C.

Carrier	Temperatures					
	25 °C			37 °C		
	Slope	Solubility ^a	ΔG_{tr}^b	Slope	Solubility ^a	ΔG_{tr}^b
PEG 1500	0.0041	0.3 \pm 0.006	- 171.27	0.1102	0.6 \pm 0.006	- 575.47
PEG 4000	0.051	0.37 \pm 0.004	- 691.36	0.2449	0.76 \pm 0.004	- 245.56
PEG 6000	0.8308	1.61 \pm 0.006	- 4336.58	0.6434	1.69 \pm 0.021	- 1185.38

^aValues of solubility in 1.5% (w/v) of carrier concentration, in mg/mL \pm SD, $n = 3$

^bGibbs energy free in J/mol.

In accordance with results the most negative values of ΔG_{tr} were found for carrier PEG 4000 and PEG 6000 for higher concentrations of carrier. After evaluation of the results obtained carriers PEG 4000 and PEG 6000 were selected for the preparation of the PMs and SDs. All formulations were prepared in the drug-carrier proportion of 1:1 and 1:10 (w/w).

Solid state characterization study

FT-IR spectroscopy studies

Spectroscopy analysis was utilized for verification of nature of interactions between AMH and carrier PEG 6000. According to Verheyen *et al.*, 2002, hydrogen bonding could be expected from the hydroxyl groups of PEG 6000. In the case of the AMH spectrum, the peaks in the region between 2960 and 2800 cm^{-1} are assigned to aliphatic C-H, the absorption bands characteristic to tert-amine NH^+ stretching are located in the 2700-2200 cm^{-1} range, at 1558 cm^{-1} and 1529 cm^{-1} related to aromatic C=C ring stretching. The spectrum of pure AMH, PEG 6000 and solid dispersions by fusion method are shown in figure 2.

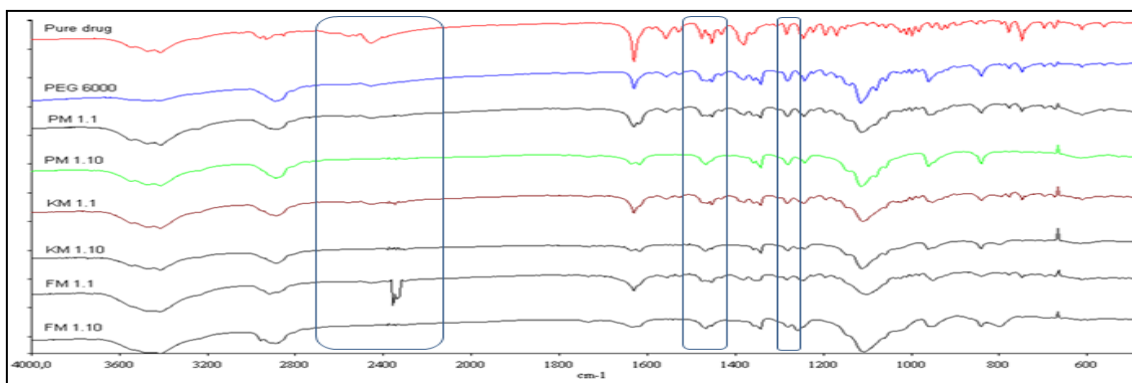


FIGURE 2 – FT-IR of the AMH pure (A), PEG 6000 (B), physical mixture, kneading method and fusion method.

The intensity of peaks in 1477 and 1454 cm^{-1} for the aromatic C=C ring semi-circle, at 1284 cm^{-1} specific to the ketonic C=O binding, had a significant reduction in the spectrum of the solid dispersion by fusion method 1:10 (w/w), moreover the bands between $2700\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ disappear from spectrum of solid dispersion. The FT-IR spectrum indicates that there is interaction between solid dispersion compounds and that it is likely that the complexation process was performed at the tert-amine of the AMH molecule.

XRD analysis

The solubility, dissolution rate and bioavailability of some drugs can be parameters that depend on the solid-state form of the particles as amorphous, crystalline or polymorphic. The crystal is an organized structure in relation to molecules and atoms, on the other hand the amorphous form is characterized by a random, generally more soluble state (MARKOVICH *et al.*, 1997).

The XRD pattern of pure drug, physical mixture and their solid dispersion using PEG 6000 as carrier are shown in Figure 3. The XRD pattern of pure AMH showed intense peaks of crystallinity and PEG 6000 exhibited distinct patterns with diffraction peaks. This characteristic was also observed in studies by MANDAL *et al.*, 2010, RIEKES *et al.*, 2010, when the interaction between simvastatin and PEG 6000 and AMH and β -cyclodextrin, respectively was evaluated.

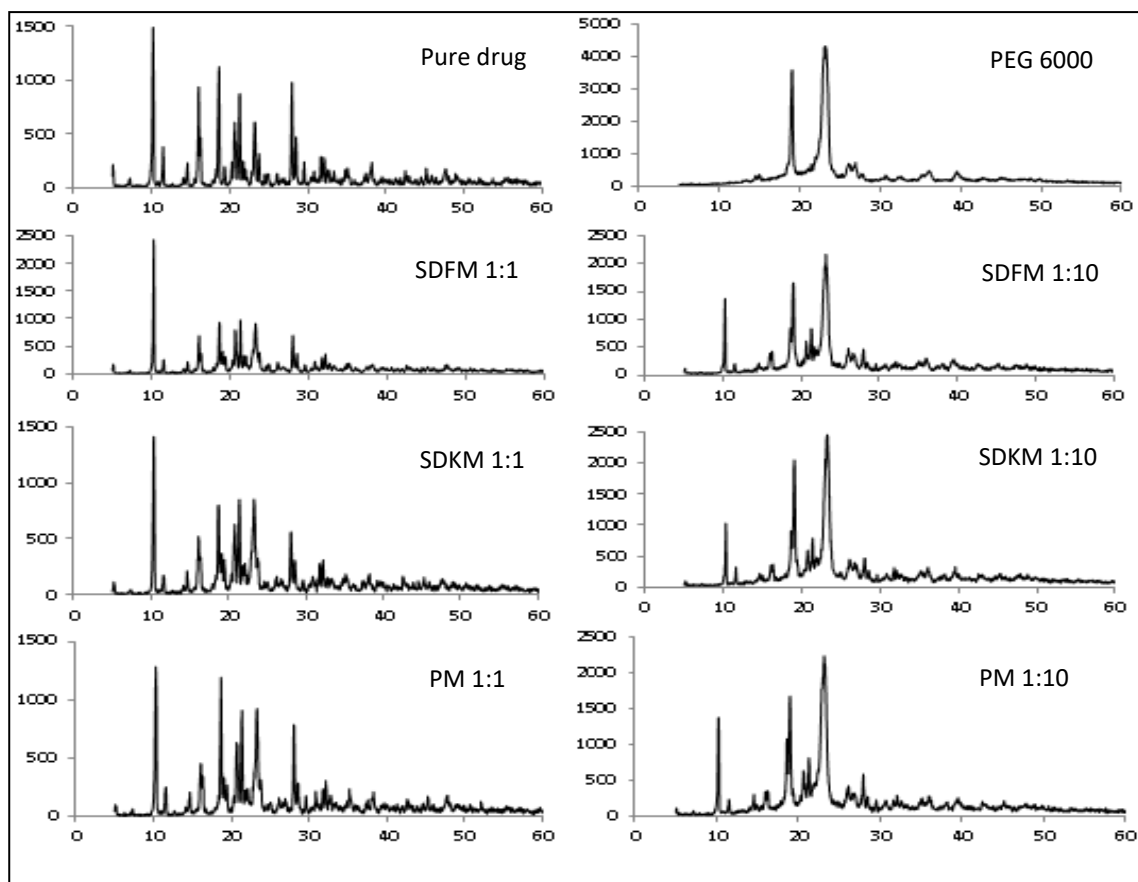


FIGURE 3 – X-ray diffraction patterns of AMH, physical mixture and solid dispersions.

PM and SDKM showed characteristic peaks of both drug and polymer indicating the presence of drug crystallinity in these samples. In solid dispersion by fusion method in a proportion of 1:10 (SDFM 1:10), the intensity of characteristic drug peaks decreased and some peaks were suppressed, thus indicating reduction of drug crystallinity.

***In vitro* dissolution profiles**

For drugs with low gastrointestinal solubility and high permeability, in this case the AMH, oral drug release is a limiting step for bioavailability. According to some authors, by improving drug solubility it is possible to enhance their bioavailability and reduce side effects. This effect of the increased bioavailability is so great that the dose administered could be lowered (LEUNER, DRESSMAN, 2000; STREUBEL, SIEPMANN, BODMEIER, 2006; VASCONCELOS, SARMENTO, COSTA, 2007). Poorly water-soluble drugs exhibit an insufficient dissolution rate and potential bioavailability problems due to erratic and

incomplete absorption from the gastrointestinal tract (BANKAR, MAHATMA, 2012; CHIOU, RIEGELMAN, 1971).

The dissolution profiles of pure drug, physical mixture and solid dispersions in 1:1 and 1:10 ratios (w/w) using PEG 4000 and PEG 6000 in dissolution mediums such as water and acetate buffer pH 4.5 are shown in Figure 4 and Figure 5, respectively.

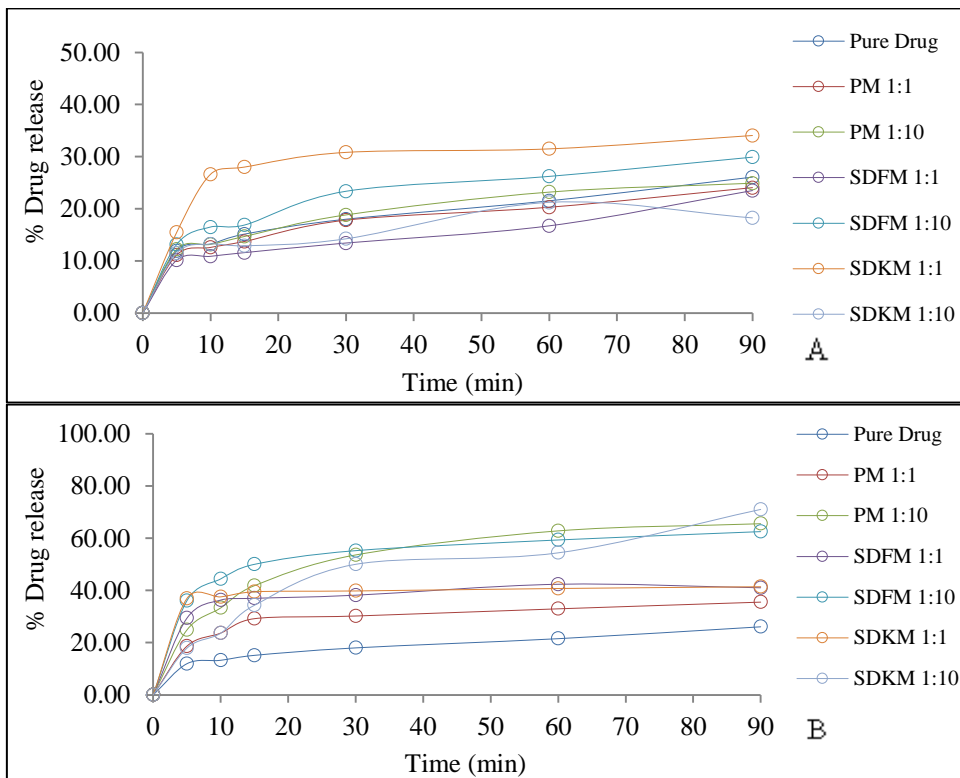


FIGURE 4 – Drug release profiles of pure AMH, physical mixture and solid dispersions obtained from fusion and kneading methods using water as dissolution medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and carrier PEG 4000 (A) and carrier PEG 6000 (B).

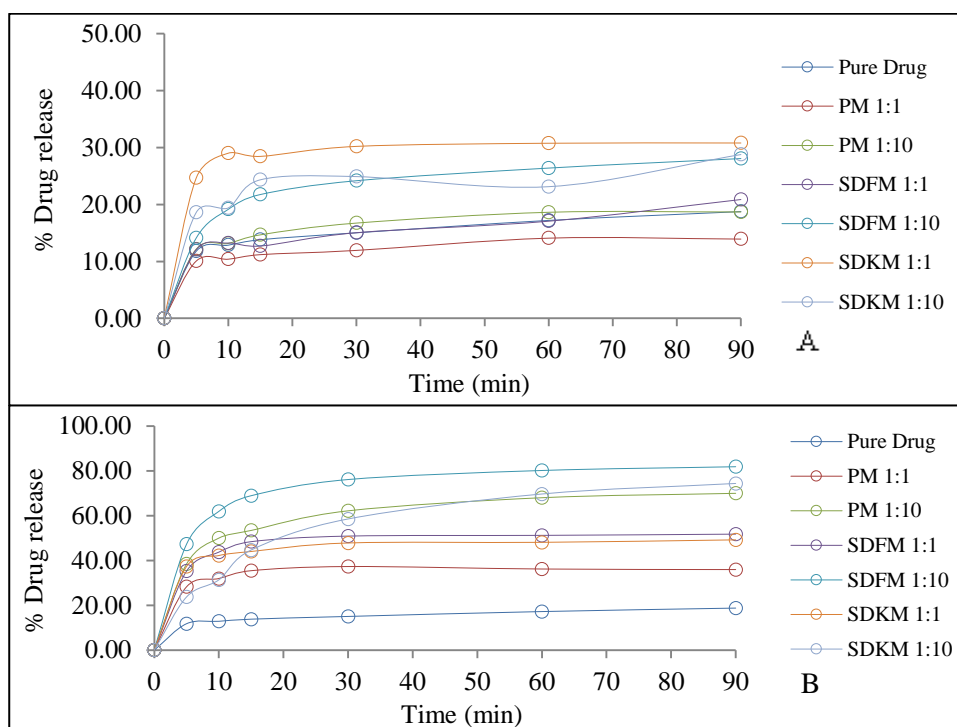


FIGURE 5 – Drug release profiles of pure AMH, physical mixture and solid dispersions obtained from fusion and kneading methods using acetate buffer pH 4.5 as dissolution medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and carrier PEG 4000 (A) and carrier PEG 6000 (B).

Using PEG 4000 for preparation of formulations by the kneading method in the drug carrier proportion of 1:1 (w/w), the highest values of dissolution rate of AMH were 0.038 mg/mL and 0.034 mg/mL in water and acetate buffer pH 4.5, respectively. For preparation methods by fusion and physical mixture the drug dissolution was similar for both mediums and proportions of drug-carrier evaluated. On the other hand, using PEG 6000 as carrier, the dissolution rate of AMH was greater and faster for formulation prepared by the fusion method in a 1:10 (w/w) proportion of drug carrier in both dissolution mediums. After evaluation of the dissolution rate between the mediums, the drug solubility was more relevant when acetate buffer pH 4.5 was utilized as a dissolution medium.

The product prepared by the fusion method at a proportion of 1:10 (w/w) presented approximately a 4.4 fold increased solubility in acetate buffer 4.5 when compared with pure drug, demonstrating that it is an important tool for increasing the solubility of many molecules in biological fluids. With solid dispersion it became clear that drug solubility was increased compared with pure drug. This is explained by the formation of amorphous particles

(as indicated by XRD analysis results), reduction of particle size and consequently larger surface area in contact with medium (LEUNER, DRESSMAN, 2000).

Solid dispersions are one of the most successful strategies to improve solubility of drugs with low gastrointestinal solubility, where this promotes a greater quantity of drug molecules dissolved and free to be absorbed in the intestinal mucosa as in the case of AMH.

CONCLUSION

In this work solid dispersions were prepared with AMH and PEG 1500, 4000 and 6000 with different weight rates and methods. In the solubility study the AMH shows a good result in water and acetate buffer pH 4.5 when compared with other mediums tested. The apparent solubility of AMH increased with increasing temperature and carrier concentrations and a more negative value of Gibbs free energy was obtained with carrier PEG 6000. FTIR and XDR studies showed evidence of interaction between the drug and PEG 6000 carrier for formulation SDFM 1:10 (w/w). Furthermore, this formulation showed significantly higher drug solubility compared with pure drug after *in vitro* dissolution studies. In conclusion, these results could be an indication that solid dispersion by the fusion method could be useful for the development of pharmaceutical products containing AMH.

REFERENCES

ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; ALBUQUERQUE, C.T.; SILVA, E.R.; VIEIRA, A.C.C.; FONTES, D.A.F.; FIGUEIRÊDO, C.B.M.; SOBRINHO, J.L.S.; NETO, P.J.R. Solid dispersion of efavirens in PVP K-30 by conventional solvent and Kneading methods. *Carbohydr.Polym.*, v.104, p.166-174, 2014.

AMIDON, G. L.; LENNERNÅS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification: The Correlation of *in vitro* Drug Product Dissolution and *in vivo* Bioavailability. *Pharm. Res.*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

AVDEEF, A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v.59, p.568-590, 2007.

BADRY, M.; FETIH, G.; FATHY, M. Improvement of solubility of dissolution rate of indomethacin by solid dispersion in Gelucire 50/13 and PEG 4000. *S.P.J.*, v.17, p.217-225, 2009.

BANKAR, P.V.; MAHATMA, O.P. Improved dissolution rate of leflunomide using hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexation by Freeze-Drying Method. *Int. J. Drug Deliv.*, v.4, n.4, p.498-506, 2012.

BOURY, F.; GAUTIER, J.; BOULIGAND, Y.; PROUST, J. Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions. *Colloids. Surf. B.*, v.20, p.219-227, 2001.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 2012. v.1, p.137-138.

CHIOU, W.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical application of solid dispersion system. *J. Pharm. Sci.*, v.60, n.9, p.1281-1302, 1971.

CHOW, A.; HSIA, C.; GORDON, J.; YOUNG, J.; BUTLER, E. Assessment of wettability and its relationship to the intrinsic dissolution rate of doped phenytoin crystals. *Int. J. Pharm.*, v.126, n.1-2, p.21-28, 1995.

EGHRARY, S.H.; ZARGHAMI, R.; MARTINEZ, F.; JOUYBAN, A. Solubility of 2-butyl-3-benzofuranyl 4-(2-(diethylamino)ethoxy-3,5-diiodophenyl ketone hydrochloride (Amiodarone HCl) in ethanol + water and *N*-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures at various temperatures. *J. Chem. Eng. Data.*, v.57, n.5, p.1544-1550, 2012.

ELHASI, S.; ASTANEH, R.; LAVASANIFAR, A. Solubilization of an amphiphilic drug by poly(ethylene oxide)-block-poly(ester) micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.65, n.3, p.406-413, 2007.

FLEGO, C.; LOVRECICH, M.; RUBESSA, F. Dissolution rate of griseofulvin from solid dispersion with poly(vinylmethylether: maleic anhydride). *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.14, n.9, p.1185-1202, 1998.

HABIB, F.S.; ATTIA, M.A. Effect of particle size on the dissolution rate of monophenylbutazone solid dispersion in presence of certain additives. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.11, n.11, p.2009-2019, 1985.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, v.4, p.117-212, 1965.

JABLAN, J.; SZALONTAI, G.; JUG, M. Comparative analysis of zaleplon complexation with cyclodextrins and hydrophilic polymers in solution and in solid state. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.71, p.35-44, 2012.

JOUYBAN, A.; EGHARY, S.H.; ZARGHAMI, R. Solubility of amiodarone HCl in propylene glycol + ethanol, propylene glycol + water and their ternary solvent mixtures at 25 and 37 °C. *J. Mol. Liq.*, v.186, p.52-55, 2013.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.; AMIDON, G.L. Molecular Properties of Who Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol. Pharm.*, v.1, n.1, p.85-96, 2004.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.50, p.47-60, 2000.

LLOYD, G.R.; CRAIG, D.Q.M.; SMITH, A. A calorimetric investigation into the interaction between paracetamol and polyethylene glycol 4000 in physical mixes and solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.48, n.1, p.59-65, 1999.

MANDAL, D.; OJHA, P.K.; NANDY, B.C.; GHOSH, L.K. Effect of carriers on solid dispersions of Simvastatin (Sim): Physico-chemical characterizations and dissolution studies. *Der. Pharm. Lett.*, v.2, n.4, p.47-56, 2010.

MARKOVICH, R.J.; EVANS, C.A.; COSCOLLUELA, C.B.; ZIBAS, S.A.; ROSEN, J. Spectroscopic identification of an amorphous-to-crystalline drug transition in a solid

dispersion SCH 48461 capsule formulation. *J. Pharmaceut. Biomed.*, v.16, n.4, p.661-673, 1997.

MARTÍN-ALGARRA, R.; COSTA, R.; MERINO, M.; CASABÓ, V. Effects of polysorbate 80 on amiodarone intestinal absorption in the rat. *Int. J. Pharm.*, v.122, n.1-2, p.1-8, 1995.

MESHAL, A.M.; MAHROOK, M.G.; ANGARY, A.A.; GOUDA, W.M. Interaction of carbamazepine with cyclodextrins. *Pharm. Ind.*, v.55, n.12, p.1129-1132, 1993.

MODI, A.; TAYADE, P. Enhancement of dissolution profile by solid dispersion (kneading) technique. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v.7, n.3, p.1-6, 2006.

MUTALIK, S.; ANJU, P.; MANOJ, K.; USHA, A.N. Enhancement of dissolution rate and bioavailability of aceclofenac: a chitosan-based solvent change approach. *Int. J. Pharm.*, v.350, n.1-2, p.279-290, 2008.

PADURARU, O.M.; BOSÎNCEANU, A.; TÂNTARU, G.; VASILE, C. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility of an antiarrhythmic agent. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.52, n.5, p.2174-2181, 2013.

PATEL, R.P.; PATEL, D.J.; BHIMANI, D.B.; PATEL, J.K. Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K30. *Dissolut. Technol.*, v.15, n.3, p.17-25, 2008.

RAVIN, L.J.; SHAMI, E.G.; RATTIE, E.S. Micelle formation and its relationship to solubility behavior of 2-butyl-3-benzofuranyl-4-(2-(diethylamino)ethoxy)-3,5-diodophenylketone hydrochloride. *J. Pharm. Sci.*, v.64, p.1830-1833, 1975.

RIEKES, M.K.; TAGLIARI, M.P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; SILVA, M.A.S.; STULZER, H.K. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. *Mater. Sci. Eng.*, v.30, p.1008-1013, 2010.

SAMMOUR, A.O.; HAMMAD, A.M.; MEGRAD, A.N.; ZIDAN, S.A. Formulation and optimization of mouth dissolve tablets containing rofecoxib solid dispersion. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v.7, n.2, p.167-175, 2006.

STREUBEL, A.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Curr. Opin. Pharmacol*, v.6, p.501-508, 2006.

TAYLOR, L.S.; ZOGRAFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharm. Res.*, v. 14, n.12, p.1691-1698, 1997.

The Index Merck, 30th ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, Merck&CO, INC. 2001. CD-ROM.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 35.ed. Rockville: United States Pharmacopeia convention, 2012. 2880 p.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug. Discov. Today.*, v.12, n. 23, p.1068-1075, 2007.

VEMULA, V.; LAGISHETTY, V.; LINGALA, S. Solubility enhancement Techniques. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, v.5, n.1, p.41-51, 2010.

VERHEYEN, S.; BLATON, N.; KINGET, R.; MOOTER, V. Mechanism of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersion. *Int. J. Pharm.*, v.249, n.1-2, p.45-58, 2002.

WAARD, H.; HINRICHS, W.L.J.; VISSER, M.R.; BOLOGNA, C.; FRIJLINK, H.W. Unexpected differences in dissolution behavior of tablets prepared from solid dispersions with a surfactant physically mixed or incorporated. *Int. J. Pharm.*, v.349, n.1-2, p.66-73, 2008.

ZISIOU, E.P.; PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.C.M.F.S.; SIQUET, C.; LIMA, J.L.F.C.
Sensitive sequential injection determination of naproxen based interaction with cyclodextrin.
Talanta., v.68, n.2, p.226-230, 2005.

Capítulo 7. ARTIGO 2

Artigo submetido ao periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*

Inclusion complex of amiodarone hydrochloride with cyclodextrins: preparation,
characterization and dissolution rate evaluation

Inclusion complex of amiodarone hydrochloride with cyclodextrins: preparation, characterization and dissolution rate evaluation

Alexandre M. Rubim^{*1,2}, Jaqueline B. Rubenick¹, Marcela Maurer², Luciane V. Laporta^{1,2}, Clarice M. B. Rolim¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

²Laboratory Drug Quality Control, Franciscan University Center, Santa Maria, RS, Brazil

***Correspondence:**

A. M. R.

Laboratory Drug Quality Control,

Franciscan University Center, CEP: 97010032 - Santa Maria - RS, Brazil

E-mail: alexandre.rubim01@gmail.com

ABSTRACT: This study aimed to improve the water solubility of amiodarone hydrochloride (AMH) via inclusion complexes with β -cyclodextrin, methyl- β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Inclusion complexes were developed by physical mixture, coevaporation, spray-drying and freeze-drying. Solid state analysis was performed using X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and scanning electronic microscopy. Thermodynamic studies demonstrate that the inclusion complexes of drug into different cyclodextrins were an exothermic process and which occurred spontaneously. Water solubility and drug dissolution rates were significantly increased after the formation of inclusions complexes with the cyclodextrins evaluated in relation to the physical mixture and pure drug. The present study provides useful information for the potential application of complexation with amiodarone HCl. This may be a good strategy for the development of solid pharmaceutical dosage forms.

Key words: Cyclodextrins; Inclusion complexes; Amiodarone HCl; Dissolution rate

INTRODUCTION

Amiodarone Hydrochloride (AMH), chemically known as (2-Butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl]methanone hydrochloride, used for the treatment of both supraventricular and ventricular arrhythmias (Lafuente-Lafuente *et al.*, 2009). AMH is a white or almost white, crystalline powder and is very slightly soluble in water ($0.2 - 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) (British Pharmacopoeia, 2012; Eghrary *et al.*, 2012). According to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), AMH is a class II. Class II drugs are those with low solubilities and high permeabilities (Amidon *et al.*, 1995; Benet, 2005).

For drugs with low gastrointestinal solubility and high permeability, dissolution in physiological fluids is the limiting step for oral bioavailability. For the pharmaceutical industry these properties are a challenge since more than 70% of the new drugs have low solubility demonstrating deficient biopharmaceutical properties (Ku, Dublin, 2012; Leuner, Dressman, 2000; Riekes *et al.*, 2010; Svenson, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2007).

In order to improve drug solubility in physiological fluids, their effectiveness should be increased, and the doses administered and toxic effects reduced. Several strategies can be employed, such as development of solid dispersion, inclusion complexes containing cyclodextrin, chemical modification, particle micronization, pH adjustment, micellar solubilization and supercritical fluid (Adeli, 2014; Alves *et al.*, 2014; Chaudhary *et al.*, 2012; Frizon *et al.*, 2013; GURSOY, Benita, 2004; Jagdale *et al.*, 2012; Li-hong *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2012; Maulvi *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2008; Sathigari *et al.*, 2009).

Cyclodextrins (CDs) are cyclic organic compounds composed of different D-glucopyranose units. CDs containing six, seven or eight natural glucose units obtained in high quantity denominated α -cyclodextrin (α -CD), β -cyclodextrin (β -CD) and γ -cyclodextrin (γ -CD), respectively. These structures showed different values of solubility in water and at the same time are capable of hosting hydrophobic molecules (Loftsson, Brewster, 1996; Rajewski, Stella, 1996; Uekama, 2004).

This work aimed to develop inclusion complexes using cyclodextrins for the purpose of improving water solubility and dissolution rate of AMH. The solid state physicochemical properties were assessed using powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, Fourier-transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Furthermore, *in vitro* dissolution profiles using different dissolution media were performed to investigate the increased solubility of this drug.

MATERIALS AND METHODS

Materials

AMH (purity > 99%) was obtained from Brazilian Pharmacopeia, batch 1040. The raw material AMH batch: CAD20131006 (purity > 99%) was purchased from Zhejiang Pharmaceutica[®] (Hong Kong, China). β -Cyclodextrin (β -CD), Methyl- β -Cyclodextrin, (Methyl- β -CD) and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD), with an average degree of molar substitution per anhydroglucose unit of 0.6, purchased from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). Ultra-pure deionized water was generated from a Millipore Milli-Q Gradient System (Billerica, MA, USA). Other reagents and solvents used were of analytical grade.

Preparation of physical mixture and inclusion complexes

Physical mixture and inclusion complexes of AMH and CDs at a 1:1 molar ratio were performed by different techniques:

- *Physical mixture* (PM): The PM was prepared by mixing previously weighed powders in a ceramic mortar for 10 min.
- *Coevaporation* (CE): The product was prepared by dissolving a known amount of AMH and CDs in suitable volumes of water:ethanol (1:1) solution. The mixture was stirred for 2 hours and then solvent was removed in a vacuum oven at 40 °C for 72 hours.
- *Freeze-drying* (FD): The product was prepared by dissolving the CDs in water:ethanol (1:1) solution and adding a known amount of AMH. The mixture was agitated for 5 h at 40 °C and organic solvent was evaporated by rotary evaporation at 40 °C under reduced pressure (- 700 mm Hg) (Fisatom[®], model 802). The solution was placed in a freezer at -80 °C for 24 hours and lyophilized in a freeze-dryer Jouan LP3, (model 60) for 24 hours.
- *Spray-drying* (SD): The product was prepared by dissolving the CDs in water:ethanol (1:1) solution and adding a known amount of AMH. The mixture was agitated for 24 h at 25 °C. The mixture was spray-dried using a LabMaq Brazil[®] (model MSDi 1.0) spray dryer under the following conditions: sample feed rate of 4 mL/min, inlet temperature 135 °C, outlet temperature 105 °C and air flow rate of 45 L/min.

pH-Dependent solubility and Phase solubility studies

The pH-dependent solubility studies were determined in pH 1.2, 4.5 and 6.8 buffer solution and distilled water at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. An excess quantity of AMH was placed in an erlenmeyer flask containing 10 mL of different solutions. The samples were covered to avoid solvent loss and then shaken at 140 rpm in an orbital shaking incubator (Novatecnica[®], NT712) for 24 hours. After equilibrium, samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes, and then the concentration of AMH in supernatant liquid was determined by HPLC (Rubim *et al.*, 2015).

The phase solubility studies were performed according to the method reported by Higuchi and Connors (1965). Briefly, an excess amount of AMH was transferred to an erlenmeyer flask containing 10 mL cyclodextrins aqueous solutions at concentrations ranging from 0 to 10.0 mM. The flasks were covered to avoid solvent loss and then shaken at 140 rpm in an orbital shaking incubator for 24 hours at different temperatures $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. After equilibrium, samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes, and then the concentration of AMH in supernatant liquid was determined by HPLC. All the experiments were performed in triplicate. The apparent complexation constants ($K_{1:1}$, M^{-1}) of the complexes were determined in accordance with Eq. (1) from phase solubility slope, where the intercept is the intrinsic solubility of drug absence of cyclodextrins.

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{\text{Intercept} (1 - \text{Slope})} \quad (1)$$

Thermodynamic parameters were obtained as a function of the temperature and complexation constant. The changes Gibb's free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) were determined using (Eq (2), (3) and (4)), respectively, where R is the gas constant ($8.314\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$) and T is temperature in Kelvin.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2)$$

$$\ln \left(\frac{K_2}{K_1} \right) = \Delta H \frac{T_2 - T_1}{RT_2 T_1} \quad (3)$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (4)$$

Characterization of the inclusion complex

X-ray powder diffraction analysis (XRD) Calorimetry

The diffraction patterns of samples were obtained using an X-ray diffractometer (Rigaku[®], Miniflex 300), using Cu as an anode material, operated at a voltage of 10 mA, 30 kV, monochromatic radiation ($\lambda = 1.54051 \text{ \AA}$). The samples were analyzed from 5° to 50° in the range of 2θ , in increments of 0.09 °/s.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC studies were obtained in a DSC-60 cell (Shimadzu[®]) with sensibility of 0.1 °C, using aluminum crucibles with about 2 mg of sample. The temperature of analysis was 30 to 300 °C, with a heating rate of 10 °C min⁻¹ in a nitrogen atmosphere with a flow rate of 100 mL min⁻¹.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

With the help of the scanning electron microscope (Philips, Model XL 30) at an intensity of 10 kV, the samples were mounted onto a metallic base using double-sided adhesive tape vacuum-coated with gold.

Dissolution studies

The dissolution studies were performed in 500 mL dissolution medium (i.e. water, acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer 6.8) at 37 °C \pm 0.5 °C using USP Apparatus 2 at 50 rpm. Briefly, AMH (50 mg), the physical mixture (PM) and inclusion complexes containing equivalent amount of AMH were separately added into vessel at rotation speed of 50 rpm. At a pre-specified interval time, samples (10 mL) were collected and replaced with an equal volume of fresh medium to maintain a constant total volume. The percentage of drug dissolved was determined using the HPLC method.

RESULTS AND DISCUSSION

pH-Dependent solubility and Phase solubility studies

The solubility of AMH as a function of pH was determined in various aqueous media (water, acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8). The solubility values found were: in water, 21.86 \pm 1.6011 $\mu\text{g mL}^{-1}$; in acid buffer pH 1.2, 8.33 \pm 0.1162 $\mu\text{g mL}^{-1}$; in acetate buffer pH 4.5, 26.93 \pm 0.2944 $\mu\text{g mL}^{-1}$; in phosphate buffer pH 6.8, 1.18 \pm

0.0877 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In solutions with low pH the AMH has appreciable solubility due to its basic nature and ionization (6.56 ± 0.06). On the other hand it is obvious that AMH shows low solubility in a higher pH solution in which it remains in a unionized form (Lamprecht *et al.*, 2002; Paduraru *et al.*, 2013).

The solubility compartment found are according to the low solubility obtained with acid buffer pH 1.2 can be explained due the formation of insoluble complex between drug and anions dissolved in buffer solution (Avdeef, 2007; Boury *et al.*, 2001; Ravin, Shami, Rattie, 1975).

Phase solubility studies were used for the evaluation of AMH behavior in an aqueous solution of β -CD, Methyl- β -CD and HP- β -CD at 25 and 37 $^{\circ}\text{C}$. The results are shown in Fig. 1. AMH solubility linearly increased with increasing concentrations of cyclodextrins over the concentration range evaluated.

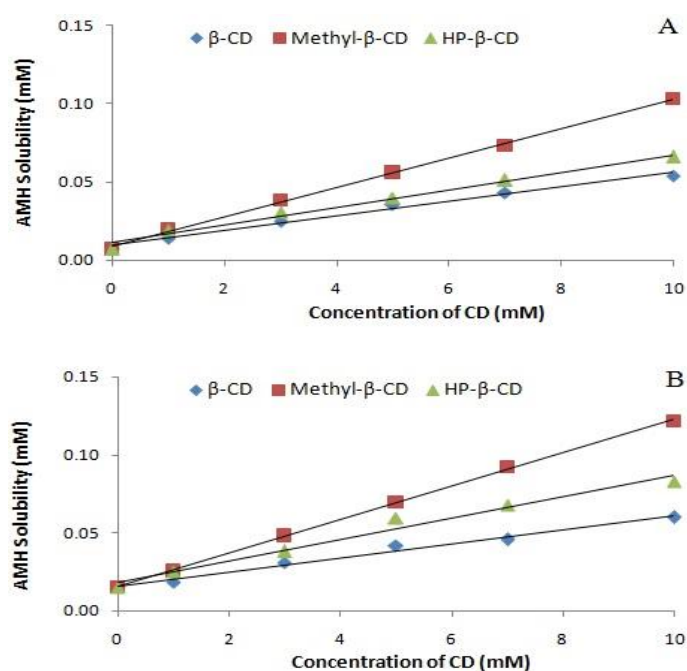


Fig 1 Phase solubility diagrams of AMH in the presence of cyclodextrins in (A) 25 $^{\circ}\text{C}$ and (B) 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$).

The diagrams obtained were classified A_L type, according to Higuchi, Connors (1965) this classification is observed when the guest solubility increases linearly with the cyclodextrin concentration, over the concentration range evaluated, indicating a 1:1 molecular complex formation between AMH and different cyclodextrins. The solubility of AMH in water increased significantly (more than 7, 14 and 9-fold at 25 $^{\circ}\text{C}$) for β -CD, Methyl- β -CD and HP- β -CD at 10 mM, respectively and (more than 4, 8 and 5-fold at 37 $^{\circ}\text{C}$) for β -CD,

Methyl- β -CD and HP- β -CD at 10 mM, respectively. This increased solubility can be explained by the formation of an inclusion complex with cyclodextrins. The thermodynamics parameters ($K_{1:1}$, ΔG , ΔH , ΔS) were calculated from the slopes of the linear phase-solubility plots, and are summarized in Table 1.

Table 1 Thermodynamic parameters obtained from phase solubility studies with AMH and cyclodextrins at different temperatures (values are the mean \pm SD of triplicate experiments)

Systems	T ^A	S ₀ ^B	K _{1:1} ^C	ΔG ^D	ΔS ^E	ΔH ^F
AMH: β -CD	25	0.009 \pm 0.001	446.23 \pm 2.1985	-15.12 \pm 0.8952	-58.46 \pm 0.9211	-32.55 \pm 0.3911
	37	0.015 \pm 0.002	268.46 \pm 1.6874	-14.42 \pm 1.0283	-58.46 \pm 0.0391	
AMH:Methyl- β -CD	25	0.008 \pm 0.004	1135.22 \pm 2.2021	-17.44 \pm 1.2418	-23.51 \pm 0.7769	-24.45 \pm 1.5885
	37	0.013 \pm 0.004	775.19 \pm 1.5733	-17.16 \pm 0.8496	-23.50 \pm 1.2059	
AMH:HP- β -CD	25	0.011 \pm 0.003	458.72 \pm 2.9982	-15.19 \pm 1.8541	-38.16 \pm 1.3361	-20.10 \pm 1.0211
	37	0.018 \pm 0.011	335.19 \pm 3.5874	-14.99 \pm 0.1774	-16.48 \pm 0.5587	

^A Temperatures evaluated in ($^{\circ}$ C);

^B Solubility of AMH in the absence of cyclodextrins (mM);

^C Apparent complexation constant (M^{-1});

^D Change in Gibbs-free energy ($KJ mol^{-1}$);

^E Change in entropy ($J mol^{-1} K^{-1}$);

^F Change in enthalpy ($KJ mol^{-1}$).

The high ($K_{1:1}$) values were observed for all cyclodextrins evaluated in this study, indicating the formation of a stable complex. The stability constants were highest for the complex formed with Methyl- β -CD, followed by HP- β -CD and β -CD. It has been suggested that the steric effect, which depends on the size of cyclodextrins, is one of the main factors of inclusion complex formation (Del Valle, 2004).

Furthermore the ΔG values were negative for all complexes, indicating that the inclusion of AMH in the different cyclodextrins is a spontaneous process and thermodynamically favorable. This increase in solubility is directly associated with values of $\Delta G_{tr} < 0$ being proportional to the increased carrier concentration (Patel *et al.*, 2008). The values of the enthalpy change (ΔH) were negative, indicating that the interaction between AMH and cyclodextrins is an exothermic process, nonetheless the magnitude of the change suggests that the interactions were of the low energy type.

Characterization of the complexes

X-ray powder diffraction analysis

X-ray analysis is a tool utilized to characterize the crystalline state, evaluation of different crystalline forms and also to confirm the formation of host-guest inclusion complexes. The solid state form of the particles as amorphous, crystalline or polymorphic is a parameter that governing the solubility and dissolution rate of drugs (Markovich *et al.*, 1997). Fig. 2 shows the diffractogram pattern of AMH and corresponding inclusion complexes with CDs prepared by different methods.

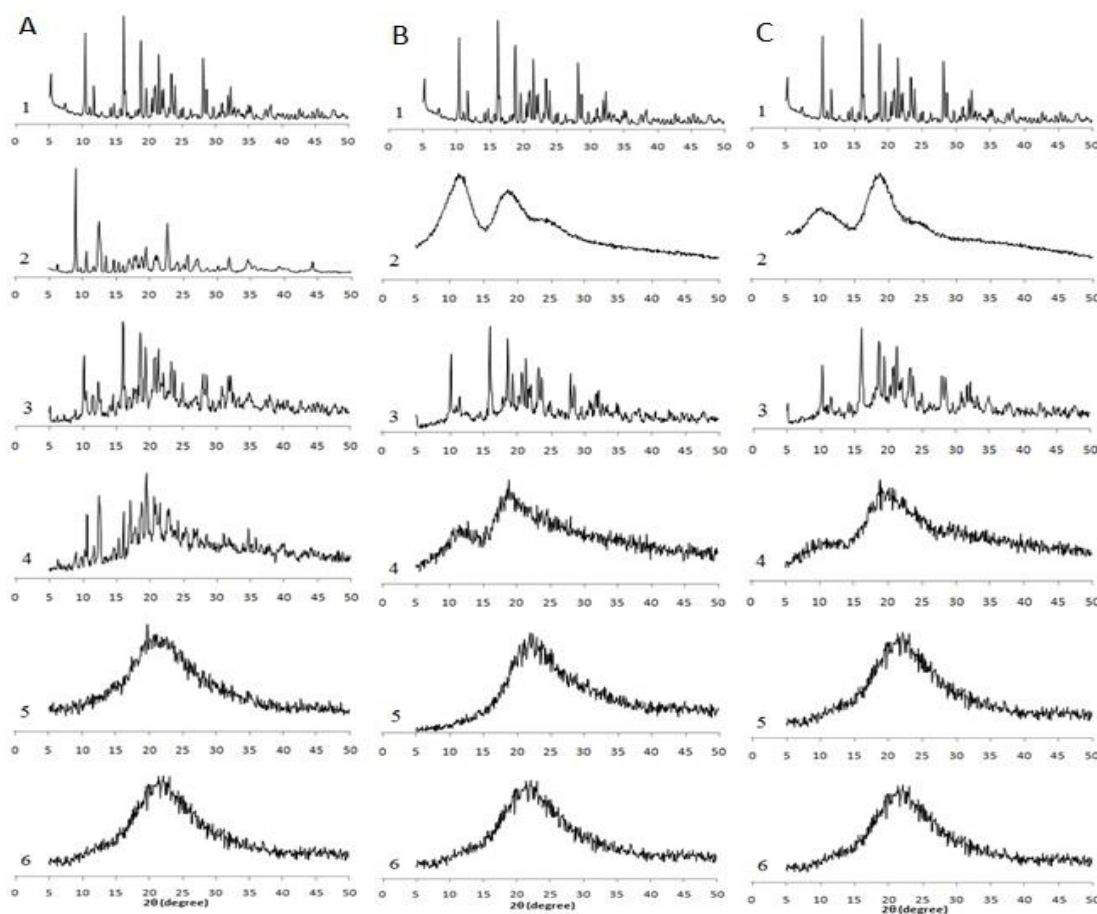


Fig 2 X-ray diffractograms corresponding to: (A): 1 – AMH, 2 - β -CD, 3 – AMH/ β -CD/PM, 4 – AMH/ β -CD/CE, 5 – AMH/ β -CD/SD, 6 – AMH/ β -CD/FD, (B): 1 – AMH, 2 - Methyl- β -CD, 3 – AMH/Methyl- β -CD/PM, 4 – AMH/Methyl- β -CD/CE, 5 – AMH/Methyl- β -CD/SD, 6 – AMH/Methyl- β -CD/FD and (C): 1 - AMH, 2 - HP- β -CD, 3 – AMH/HP- β -CD/PM, 4 – AMH/HP- β -CD/CE, 5 – AMH/HP- β -CD/SD, 6 - AMH/HP- β -CD/FD.

Fig. 2 shows the intense peaks of crystalline state of the drug structure and the influence that each CD and preparation methods can promote in the crystalline state of the drug. The PM product using the three carriers showed a diffractogram pattern similar to that of the pure drug. The CE method using β -CD showed a similar diffractogram to that of PM, while those obtained by SD and FD methods showed the absence of any peaks indicating a transition from crystalline to an amorphous state. Similar results were observed with Methyl- β -CD and HP- β -CD by spray-drying and freeze-drying methods. This solid state form transition was also observed by Bankar, Mahatma, 2012, Paduraru *et al.*, 2013 and Riekes *et al.*, 2010, when the amorphization of the compounds after complexation with cyclodextrins was demonstrated.

Thermal analysis

DSC is a tool utilized in the pharmaceutical industry for the purpose of evaluating the physicochemical properties of drugs and excipients, evaluation of degradation kinetics and stability. Furthermore, these analyses are commonly used for characterization of the solid state inclusion complexes (Vecchio *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2011). The thermal behavior of the drug, cyclodextrins and inclusion complexes are presented in Fig. 3.

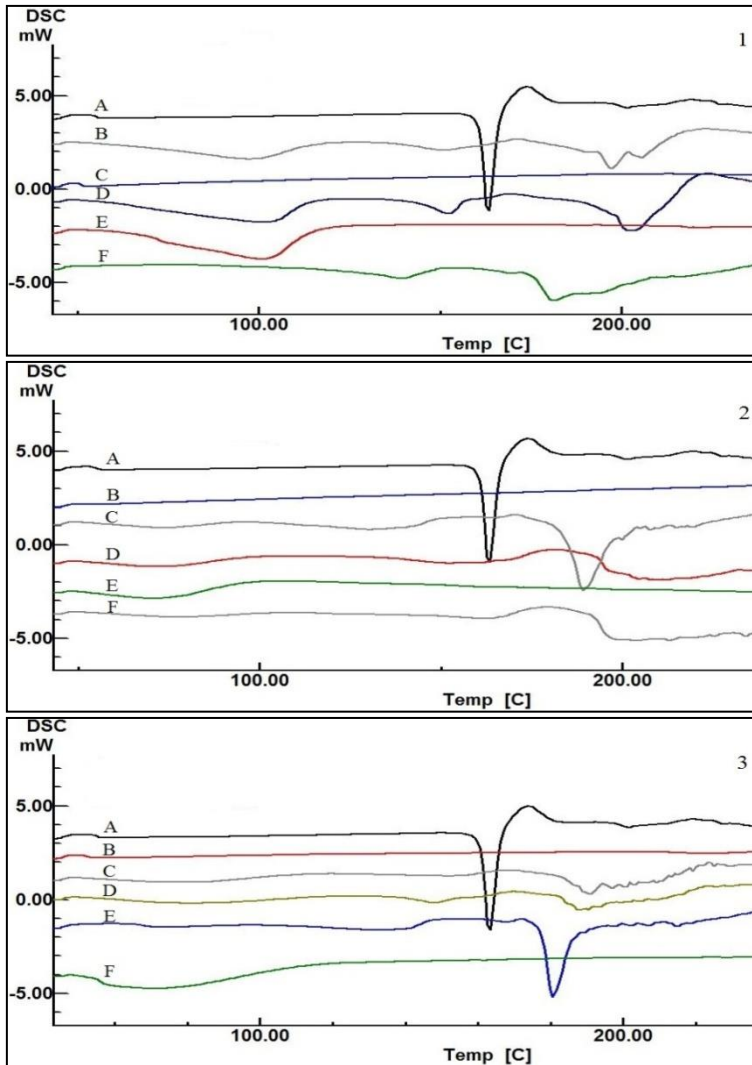


Fig 3 DSC thermograms: 1: (A) AMH powder, (B) physical mixture, (C) spray-dried, (D) coevaporated, (E) β -CD and (F) freeze-dried; 2: (A) AMH powder, (B) spray-dried, (C) coevaporated, (D) physical mixture, (E) freeze-dried and (F) Methyl- β -CD; and 3: (A) AMH powder, (B) spray-dried, (C) coevaporated, (D) physical mixture, (E) freeze-dried and (F) HP- β -CD.

The DSC curve shows that AMH has a sharp melting endothermic peak at about 163.47 °C, indicating a typical behavior of anhydrous crystalline state. This DSC curve was similar to those in other studies (Paduraru et al., 2013 and Riekes et al., 2010). During the DSC analysis the thermogram of HP- β -CD showed a very broad endothermic peak between 60 °C and 110 °C. The formulations produced by different methods containing the three cyclodextrins showed a reduction of intensity and an alteration in position of the endothermic peak of the drug. When the spray-drying method was utilized, the complete disappearance of the endothermic peak corresponding to AMH was evident, indicating the formation of an amorphous inclusion complex that was confirmed by the results obtained after XRD analysis.

Scanning electron microscopy

The images obtained for the formulations are presented in Fig. 4. The micrographs are used to evaluate the morphological aspects of polymers, solid dispersions, drugs, cyclodextrins and inclusion complexes (Naidu *et al.*, 2004).

AMH showed the irregular size and characteristic morphology of drug crystals, which is in accordance with X-ray analysis that showed the crystalline nature of AMH. It was also evident that β -CD is a crystalline solid while Methyl- β -CD and HP- β -CD are regular and spherical particles.

In the physical mixtures and coevaporation method the AMH crystals were clearly detectable on the surface of cyclodextrins indicating little complexation between compounds. All spray dried powders showed an interaction between drug and cyclodextrins, indicated by the complete disappearance of the crystalline morphology of AMH. This drastic change of morphology and particle shape was indicative of the formation of the new solid phase. Results obtained by others evaluations, DSC and X-ray powder corroborated the formation of an amorphous system.

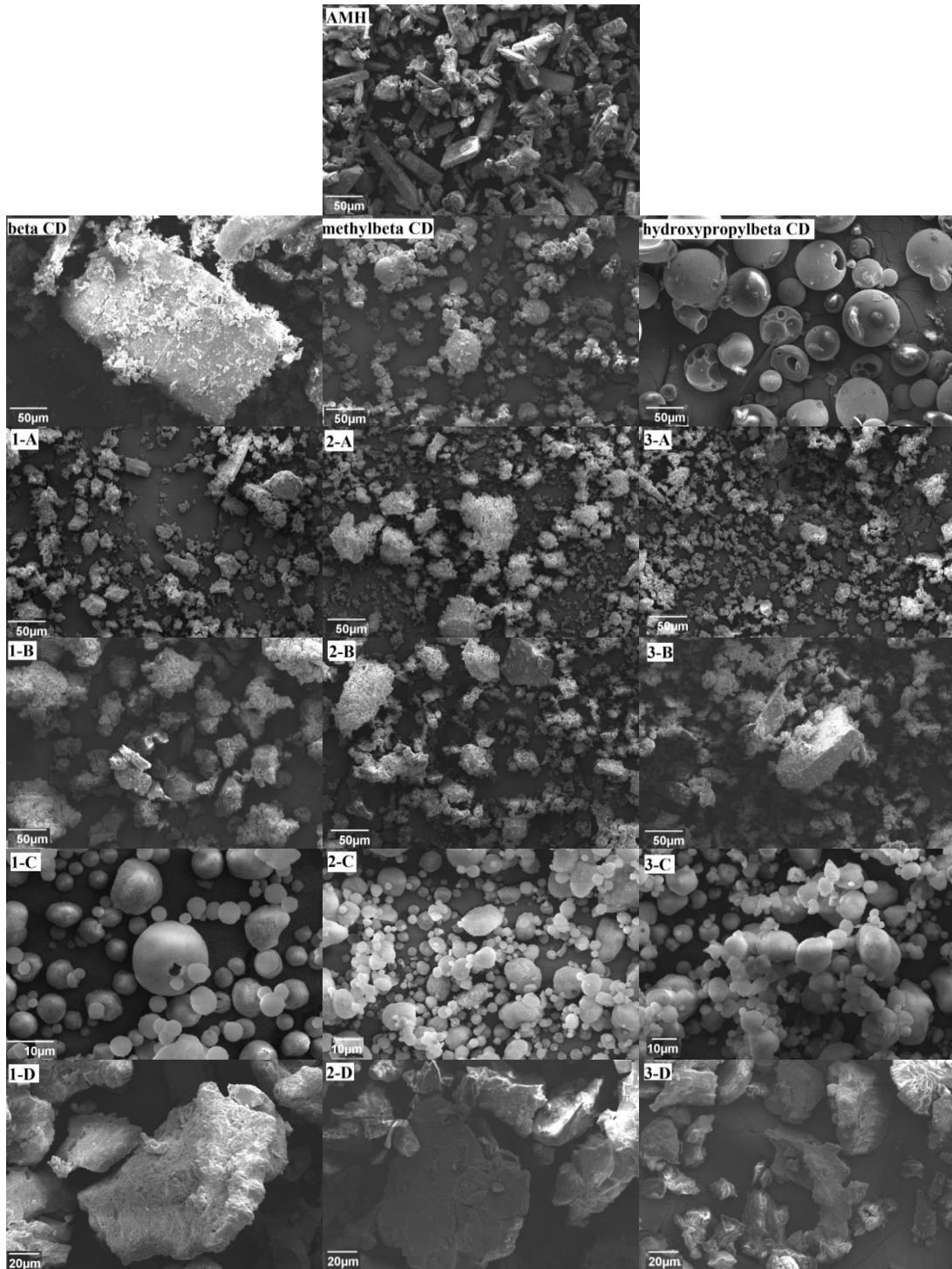
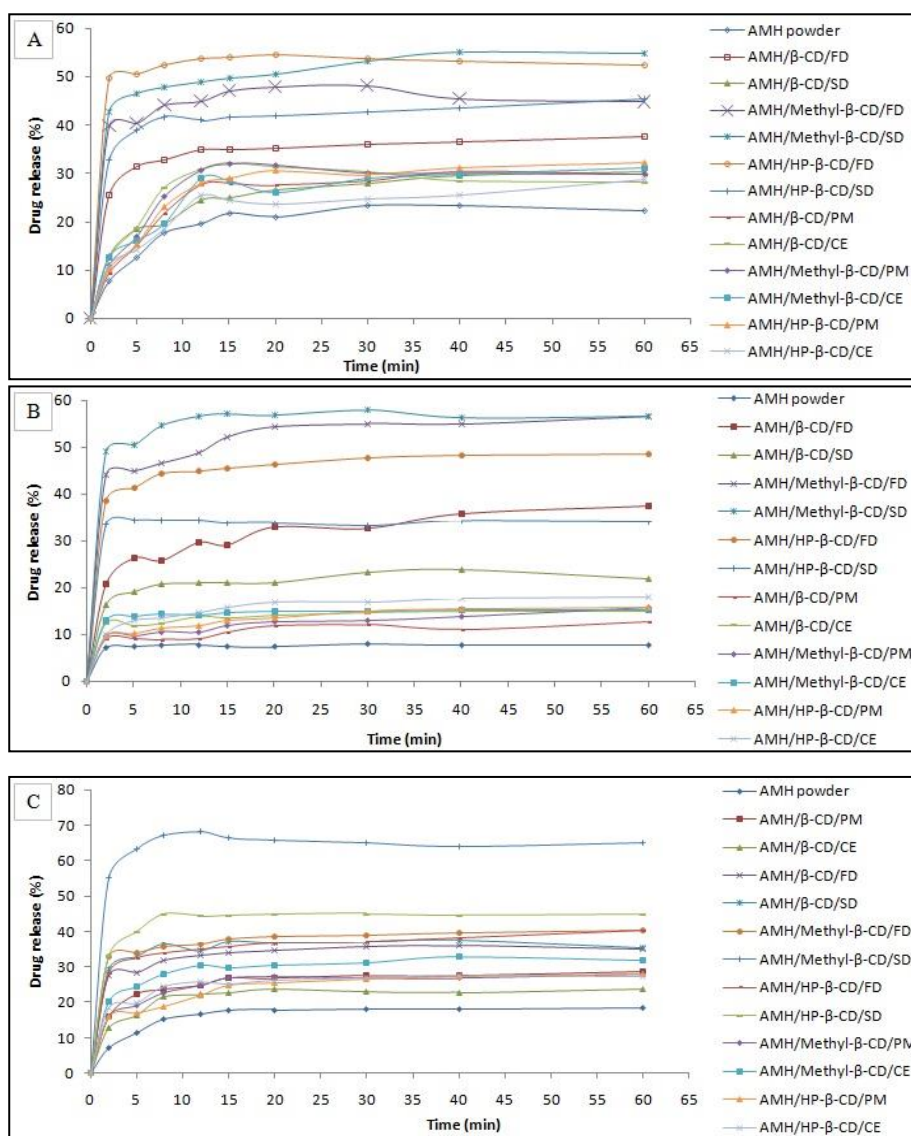


Fig. 4 Scanning Electronic Microscopic of AMH, beta-CD, methylbeta-CD, hydroxypropylbeta-CD, AMH/beta-CD/PM (1A), AMH/beta-CD/CE (1B), AMH/beta-CD/SD (1C), AMH/beta-CD/FD (1D), AMH/methylbeta-CD/PM (2A), AMH/methylbeta-CD/CE (2B), AMH/methylbeta-CD/SD (2C), AMH/methylbeta-CD/FD (2D), AMH/hydroxypropylbeta-CD/PM (3A), AMH/hydroxypropylbeta-CD/CE (3B), AMH/hydroxypropylbeta-CD/SD (3C) and AMH/hydroxypropylbeta-CD/FD (3D).

Dissolution rate studies

In drugs that present low gastrointestinal solubility and high permeability, in this case the AMH, the oral drug release is a limiting step for bioavailability. The bioavailability depends on a series of factors, including physicochemical properties of its formulation, and the physiological state of the patients (Fernandes *et al.*, 2002).

To evaluate whether the inclusion complexes affected the dissolution rates of AMH, dissolution profiles were performed on pure drug, physical mixtures and inclusion complexes with cyclodextrins, with three pH values and water. Rapid dissolution rate as compared with the pure drug is the characteristic behavior of inclusion complexes (Baboota *et al.*, 2005). Dissolution profiles for the pure AMH, physical mixture of the drug and inclusion complexes obtained by different methods are presented in Fig. 5.



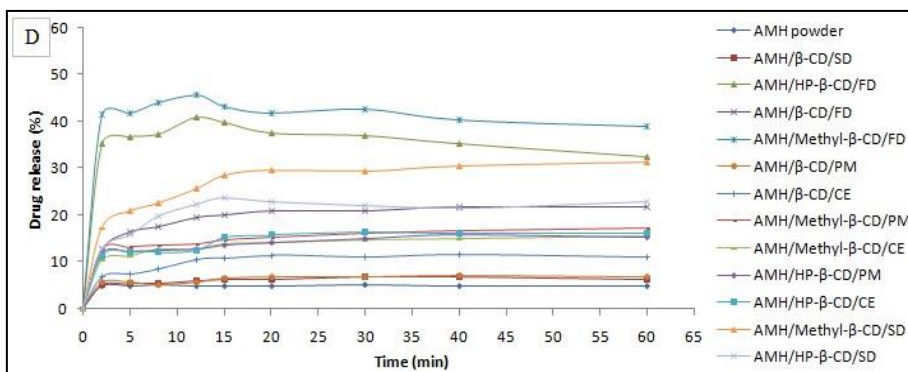


Fig. 5 Dissolution curves of AMH powder and different formulations using: (A) water, (B) acid buffer pH 1.2, (C) acetate buffer pH 4.5 and (D) phosphate buffer pH 6.8 as dissolution medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pure AMH shows about 22.20% dissolution in water, 7.83%, 18.31% and 4.82% dissolution in acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8, respectively after 60 minutes of study. As expected, AMH is a drug that depends on pH value due to the presence of a tert-amine ionizable in different fluids (Paduraru *et al.*, 2013).

The physical mixtures containing the three cyclodextrins show a similar dissolution rate about 30% at 60 minutes in water and acetate buffer pH 4.5. The increment in the dissolution rate of AMH with the physical mixture can be explained by improved drug wettability due to the presence of the cyclodextrins, which can reduce the interfacial tension between particle and dissolution medium. The coevaporation, spray-drying and freeze-drying methods of β -CD, Methyl- β -CD and HP- β -CD showed a significant increase in drug dissolution compared to physical mixture, this can be attributed to the better interaction between drug and CDs, as confirmed by physicochemical characterization.

The spray-drying products with Methyl- β -CD showed about 55%, 56%, 65% and 38% dissolution in water, acid buffer pH 1.2, acetate buffer pH 4.5 and phosphate buffer pH 6.8, respectively. The great influence of Methyl- β -CD can be explained based on its good solubility, higher amorphization, wettability and capacity of complexation in solid state (Fernandes *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

In the present work, the complex formed between AMH and CDs presented an enhanced solubility and dissolution rate for all complexes formed other than either physical mixture or pure drug. AMH solubility linearly increases with increasing concentrations of

CDs of both temperatures indicating an A_L -type diagram over the entire concentration range evaluated. The ΔG_{tr} values were negative for all formulations indicating a spontaneous process which was thermodynamically favorable to drug solubility. The K_c result suggests good stability for both temperatures evaluated of the inclusion complex formed by AMH-Methyl- β -CD. The characterization of physic-chemical results confirmed the formation of complexes with different cyclodextrins. The dissolution profiles of formulations demonstrated the great influence on drug solubility especially when prepared by the spray-drying method with Methyl- β -CD for all dissolution mediums evaluated. After studies using different CDs and complexation process, the results obtained demonstrated that the CDs are good excipients to increase molecule solubility.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the support of this work by Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil and Prof. Marcos Segatto and Raphael Nicolay of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil who performed microscopic and thermal analysis.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo melhorar a solubilidade em água do cloridrato de amiodarona (HAM) via complexo de inclusão com β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Complexos de inclusão foram desenvolvidos por mistura física, coevaporação, secagem por aspersão e liofilização. Análise em estado sólido foi realizada usando difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura. Estudos termodinâmicos demonstraram que os complexos de inclusão do fármaco em diferentes ciclodextrinas foram processos exotérmicos o qual ocorreram espontaneamente. A solubilidade em água e taxa de dissolução foram significativamente aumentadas após a formação dos complexos de inclusão com as ciclodextrinas avaliadas em relação a mistura física e o fármaco puro. O presente estudo fornece informações úteis para aplicação potencial da complexação com cloridrato de amiodarona, este fato pode ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de novas formas sólidas de dosagens.

Palavras-chave: Ciclodextrinas; Complexos de inclusão; Cloridrato de amiodarona; Taxa de dissolução

REFERENCES

ADELI, E. A comparative evaluation between utilizing SAS supercritical fluid technique and solvent evaporation method in preparation of Azithromycin solid dispersions for dissolution rate enhancement. *J. Supercrit. Fluids*. v.87, p.9-21, 2014

ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; ALBUQUERQUE, C. T.; SILVA, E. R.; VIEIRA, A. C. C.; FONTES, D. A.; FIGUEIREDO, C. B.; SOBRINHO, J. L.; NETO, P. J. Solid dispersion of efavirens in PVP K-30 by conventional solvent and Kneading methods. *Carbohydr. Polym.* v.104, p.166-174, 2014.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. *Pharm. Res.* v. 12, p.413-420, 1995.

AVDEEF, A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v.59, n.7, p.568-590, 2007.

BABOOTA, S.; DHALIWAL, M.; KOHLI, K. Physicochemical characterization, in vitro dissolution behavior, and pharmacodynamic studies of rofecoxib-cyclodextrin inclusion compounds. Preparation and properties of rofecoxib hydroxypropyl β -cyclodextrin inclusion complex: A technical note. *AAPS*. v.6, p.83-90, 2005.

BANKAR, P. V.; MAHATMA, O. P. Improved dissolution rate of leflunomide using hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexation by Freeze-Drying Method. *Int. J. Drug Deliv.* v.4, p.498-506, 2012.

BENET, L. Z. There are no useful CYP3A probes that quantitatively predict the in vivo kinetics of other CYP3A substrates and no expectation that one will be found. *Mol. Interv.* v.5, p.79-83, 2005.

BOURY, F.; GAUTIER, J.; BOULIGAND, Y.; PROUST, J. Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions. *Colloids. Surf. B.*, v.20, n.3, p.219-227, 2001.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationary Office, 2012. v.1, p.137-138.

CHAUDHARY, A.; NAGAICH, U.; GULATI, N.; SHARMA, V. K.; KHOSA, R. L. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent Review. *J.A.P.E.R.* v.2, p.32-67, 2012.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process. Biochem.*, v.39, p.1033-1046, 2004.

ECCHIO, S.; RODANTE, F.; TOMASSETTI, M. Thermal stability of disodium and calcium phosphomycin and the effects of the excipients evaluated by thermal analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* v.24, n.5-6, p.1111-1123, 2001.

EGHRARY, S. H.; ZARGHAMI, R.; MARTINEZ, F.; JOUYBAN, A. Solubility of 2-butyl-3-benzofuranyl 4-(2-(diethylamino)ethoxy-3,5-diiodophenyl ketone hydrochloride (Amiodarone HCl) in ethanol + water and *N*-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures at various temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, v.57, p.1544-1550, 2012.

FERNANDES, C. M.; VIEIRA, M. T.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.15, p.79-88, 2002.

FRIZON, F.; ELOY, J. O.; DONADUZZI, C. M.; MITSUI, M. L.; MARCHETTI, J. M. Dissolution rate enhancement of loratadine polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersion by solvent methods. *Powder Technol.* v.235, p.532-539, 2013.

GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* v.58, p.173-182, 2004.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* v.4, p.117-122, 1965

JAGDALE, S. F.; JADHAV, V. N.; CHABUKSWAR, A. R.; KUCHEKAR, B. S. Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of nifedipine-beta-cyclodextrin complexes. *Braz. J. Pharm. Sci.* v.48, n.1, p.131-145, 2012.

KU, M. S.; DUBLIN, W. A biopharmaceutical classification-based right-first-time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from first-in-human to clinical proof-of-concept. *Pharm. Dev. Technol.* v.17, p.285-302, 2012.

LAFUENTE-LAFUENTE, C.; ALVAREZ, J. C.; LEENHARDT, A.; MOULY, S.; EXTRAMIANA, F.; CAULIN, C.; FUNCK-BRENTANO, C.; BERGMANN, J. Amiodarone concentrations in plasma and fat tissue during chronic treatment and related toxicity. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* v.67, p.511-519, 2009.

LAMPRECHT, A.; BOULIGAND, Y.; BENOIT, J. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J. Control. Release*, v.84, p.59-68, 2002.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v.50, p.47-60, 2000.

LI-HONG, W.; XIN, C.; HUI, X.; LI-LI, Z.; JING, H.; MEI-JUAN, Z.; JIE, L.; YI, L.; JIN-WEN, L.; WEI, Z.; GANG, C. A novel strategy to design sustained-release poorly water-soluble drug mesoporous silica microparticles based on supercritical fluid technique. *Int. J. Pharm.* v.454, p.135-142, 2013.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* v.85, p.1017-1025, 1996.

LU, Y.; GUO, T.; QI, J.; ZHANG, J.; WU, W. Enhancement Dissolution and Stability of Lansoprazole by Cyclodextrin Inclusion Complexation: Preparation, Characterization and Molecular Modeling. *AAPS*. v.13, n.4, p.1222-1229, 2012.

MARKOVICH, R. J.; EVANS, C. A.; COSCOLLUELA, C. B.; ZIBAS, S. A.; ROSEN, J. Spectroscopic identification of an amorphous-to-crystalline drug transition in a solid dispersion SCH 48461 capsule formulation. *J. Pharmaceut. Biomed.* v.16, n.4, p.661-673, 1997.

MAULVI, F. A.; DALWADI, S. J.; THAKKAR, V. T.; SONI, T. G.; GOHEL, M. C.; GANDHI, T. R. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. *Powder Technol.* v.207, n.1-3, p.47-54, 2011.

NAIDU, N. B.; CHOWDARY, K. P.; MURTHY, K. V.; SATYANARAYANA, V.; HAYMAN, A. R.; BECKET, G. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. *J. Pharmaceut. Biomed.* v.35, n.1, p.75–86, 2004.

PADURARU, O. M.; BOSÎNCEANU, A.; TÂNTARU, G.; VASILE, C. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility of an antiarrhythmic agent. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.52, n.5, p.2174-2181, 2013.

PATEL, R. P.; PATEL, D. J.; BHIMANI, D. B.; PATEL, J. K. Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K30. *Dissolut. Technol.* v.15, n.3, p.17-25, 2008.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharma. Sci.* v.85, n.11, p.1142-1169, 1996.

RAVIN, L.J.; SHAMI, E.G.; RATTIE, E.S. Micelle formation and its relationship to solubility behavior of 2-butyl-3-benzofuranyl-4-(2-(diethylamino)ethoxy)-3,5-diiodophenylketone hydrochloride. *J. Pharm. Sci.*, v.64, p.1830-1833, 1975.

RIEKES, M. K.; TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. *Mater. Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* v.30, n.7, p.1008-1013, 2010.

RUBIM, A. M.; RUBENICK, J. B.; GREGOLIN, E.; LAPORTA, L. V.; LEITENBERG, R.; ROLIM, C. M. B. Amiodarone Hydrochloride: enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion technique. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.51, n.4, p.957-966, 2015.

SATHIGARI, S.; CHADHA, G.; LEE, P.; WRIGHT, N.; PARSONS, D. L.; RANGARI, V. K. Physicochemical Characterization of Efavirenz-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *AAPS*, v.10, n.1, p.81-87, 2009.

SOCRATES, G. Infrared Characteristics Group Frequencies. New York: Chichester, 1980. p.153.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery application. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v.71, n.3, p.445-462, 2009.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharma. Bull.* v.52, n.8, p.900-915, 2004.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug. Discov. Today.* v.12, n.23-24, p.1068-1075, 2007.

YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; SOARES, C. D. V.; OLIVEIRA, M. A. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Amiodarone Hydrochloride under isothermal conditions. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* v.37, n.6, p.638-647, 2011.

Capítulo 8. ARTIGO 3

Artigo a ser submetido ao periódico *International Journal of Pharmaceutics*

Inclusion complexes of amiodarone hydrochloride and methyl- β -cyclodextrin: formulation, characterization and in vitro dissolution profile of immediate release tablets

Inclusion complexes of amiodarone hydrochloride and methyl- β -cyclodextrin: formulation, characterization and in vitro dissolution profile of immediate release tablets

Alexandre Rubim^{a,b,*}, Jaqueline Rubenick^a, Cristiano Rhoden^c, Laura Vendrame^c, Ivanna Zanella^c, Clarice Rolim^a

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.*

^b *Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Centro Universitário Franciscano, Andradas 1614, 97010-032 Santa Maria, RS, Brazil.*

^c *Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Andradas 1614, 97010-032 Santa Maria, RS, Brazil.*

Alexandre Rubim: alexandre.rubim01@gmail.com

Jaqueline Rubenick: jaquerubenick2@gmail.com

Cristiano Rodhen: cristianorbr@gmail.com

Laura Vendrame: laura.o.vendrame@gmail.com

Ivana Zanella: ivanazanella@gmail.com

Clarice Madalena Bueno Rolim: clarice.rolim@gmail.com

*Corresponding author at: Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel. +55 55 3220 8800.
E-mail address: alexander.rubim01@gmail.com (A.M. Rubim); clarice.rolim@gmail.com (C.M. Rolim).

Abstract

The aim of this study was to develop immediate release tablets containing amiodarone hydrochloride, a BCS class II compound, using methyl- β -cyclodextrin complexation by the spray-drying process. Drug and methyl- β -cyclodextrin interactions in solution and solid state were investigated. Solubility studies demonstrated the formation of the drug-Methyl- β -cyclodextrin inclusion complex with 1:1 stoichiometry. Complex formation was characterized by SBET, XRD, DSC, SEM, FT-IR and ^1H NMR. Then, molecular modeling studies confirmed the complexation. Immediate release tablets containing the inclusion complex were developed by direct compression and in vitro dissolution studies were performed in gastrointestinal fluids using USP Pharmacopeia dissolution rate testing equipment. The dissolution rate of immediate release tablets was substantially higher than the pure drug for all mediums evaluated. Therefore, it can be concluded from the results that methyl- β -cyclodextrin can be a useful excipient for incorporation in novel dosage forms for the purpose of increasing the solubility of poorly soluble drugs.

Key-words: Molecular modeling; Inclusion complexes; Amiodarone hydrochloride; In vitro dissolution rate; Spray-drying method.

1. Introduction

Amiodarone Hydrochloride (AM) was developed originally as an antianginal agent in Belgium in 1962. After two year the oral preparation (200 mg/tablet) was approved by the Food and Drug Administration for use in the USA with antiarrhythmic properties, used for the treatment of both supraventricular and ventricular arrhythmias (Lafuente-Lafuente et al., 2009; Singh, 1983).

AM is a white or almost white, crystalline powder and is very slightly soluble in water (0.2 - 0.5 mg/mL) thus, this drug is classified as class II by the Biopharmaceutical System Classification due to poor gastrointestinal solubility and high permeability (Eghrary et al., 2012; Pharmacopoeia, B., 2012). AM is characterized by an erratic and unpredictable oral absorption that is mainly mediated by intestinal wall metabolism by CYP3A4 and gastrointestinal excretion mediated by P-gp (Libersa et al., 2000). In fact, many studies have reported techniques to enhance solubility of the drug in physiological fluids using solid dispersion and inclusion complex (Cushing et al., 2009; Paduraru et al., 2013; Riekens et al., 2010; Rubim et al., 2015; Swathi and Narender, 2015).

Cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharides and have been used as the pharmaceutical excipient (Loftsson and Brewster, 1996). The most common CD are α , β and γ , containing six, seven and eight units of glucose, respectively. CD has a central cavity with hydrophobic characteristic and its size varies according to the CD type. This arrangement permits the CD to accommodate different hydrophobic molecules and improve the physicochemical and pharmacodynamic properties. CD are capable of producing complexes with poorly soluble drugs and therefore they are used to increase chemical stability, and enhance solubility and bioavailability after oral administration (Bankar and Mahatma, 2012; Davis and Brewster, 2004; Loftsson and Brewster, 1996; Loukas et al., 1995; Mendes et al., 2016; Taupitz et al., 2013; Uekama, 2004; Yao, et al., 2014).

Until the present moment, no scientific study has been published about the development of tablets containing AM-Methyl- β -CD inclusion complex. In addition, no studies were found of molecular levels using ^1H Nuclear Magnetic Resonance and molecular modeling.

First the inclusion complex between AM and Methyl- β -CD in solution was investigated using a phase solubility diagram. The AM-Methyl- β -CD inclusion complex by spray drying was characterized by particle size analysis, ^1H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, X-ray powder diffraction, Differential Scanning Calorimetry, Scanning Electron Microscopy, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, Specific Surface Area. In

addition, molecular modeling of a complex was determined to verify its geometrical configuration. Likewise, using the complex immediate release tablets were manufactured by direct compression with a simple and easy-to-scale-up formulation strategy and finally the dissolution profile was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Amiodarone Hydrochloride (purity > 99%) was obtained from Brazilian Pharmacopeia, batch 1040. The raw material amiodarone hydrochloride batch: CAD20151005 (purity > 99.9%) was purchased from Zhejiang Pharmaceutica[®] (Hong Kong, China). Methyl- β -Cyclodextrin (DS = 1.6-2.0 mol CH₃ per unit anhydroglucose) was purchased from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). The excipients: lactose monohydrate, magnesium stearate, aerosil, povidone K-30 and maize starch were purchased from Delaware[®]. All other reagents and solvents used were of analytical grade.

2.2. Phase solubility studies

Phase solubility studies were performed according to the method reported by Higuchi and Connors (1965). Excess amounts of AM were added to 10 mL Methyl- β -CD aqueous solutions at concentrations ranging from 0 to 10.0 mM. The flasks were covered to avoid solvent loss and then shaken at 140 rpm in an orbital shaking incubator for 24 hours at 25 °C \pm 0.5 °C. After equilibrium, samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes, and then the concentration of AM in supernatant liquid was determined in a Shimadzu[®] UV-1650 spectrophotometer, λ = 240 nm. All experiments were carried out in triplicate.

The stability constants (Ks) of the complex were determined as a function of the Methyl- β -CD concentration. The Ks were determined in accordance with Eq. (1) from a phase solubility slope, where the intercept is the intrinsic solubility of drug in the absence of Methyl- β -CD.

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{\text{Intercept} (1 - \text{Slope})} \quad (1)$$

2.3. Preparation of AM-Methyl- β -CD inclusion complex

The inclusion complex of AM with Methyl- β -CD was prepared at a 1:1 M ratio by a LabMaq[®] Brazil spray dryer (MSD 0.5) using lactose (3% w/v) as a drying adjunct. AM

(weight = 6.82 g) with Methyl- β -CD (weight = 13.10 g) were dissolved in a water:ethanol (1:1) solution using moderate stirring for 24 hours at room temperature. The product was dried under the following conditions: sample feed rate of 4 mL/min, inlet temperature of 135 °C, outlet temperature of 105 °C, feed flow of 45 L/min and nozzle atomizer diameter of 0.2 mm via peristaltic pump. The yield weight process (percentage) was determined by the ratio between the total weight of the powder obtained in experiment and the total weight of the raw materials.

In addition, the AM content ($n = 3$) in dried product was determined by Shimadzu[®] liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, SIL-20A ht auto sampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A PDA detector, CBM-20A system controller, and LC solution software. The analyses were conducted using a reverse phase Phenomenex[®] Luna C18 column (150 x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase and diluent were composed of methanol:acetonitrile:buffer phosphate pH 2.2 (68:15:17 v/v) and water:methanol (1:1 v/v), respectively, with a flow rate of 1.0 mL/min, at 25.0 °C and a volume of 10 μ L was injected (Rubim et al., 2015).

2.4. Characterization of the inclusion complex

2.4.1. Specific surface area

The Specific Surface Area (SBET) of samples was determined using a surface area analyzer (Micromeritics[®], ASAP 2020) by adsorption and desorption of N₂ at 77 K. The samples were first degassed for 6 h prior to the analysis followed by N₂ adsorption at -196 °C. The SBET was determined by mathematical model BET (Brunauer et al., 1938).

2.4.2. X-ray powder diffraction

X-ray powder diffraction (XRD) patterns of samples were obtained at 25 °C using an X-ray diffractometer (Rigaku[®], Miniflex 300), with Cu as an anode material, operated at a voltage of 10 mA, 30 kV, monochromatic radiation ($\lambda = 1.54051 \text{ \AA}$). Diffraction data were collected over the angular range of $2\theta = 1^\circ$ to 70° in increments of 0.09 °/s.

2.4.3. Differential Scanning Calorimetry

Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermograms of the drug, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex were obtained in a DSC-60 cell (Shimadzu[®]) with a sensibility of 0.1 °C, using aluminum crucibles containing about 2 mg of sample. The

temperature of analysis was 30 to 300 °C, with a heating rate of 10 °C/min in a nitrogen atmosphere with a flow rate of 100 mL/min.

2.4.4. Scanning Electron Microscopy

Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed with the help of SEM (Carl Zeiss, Model Sigma 300 VP) at an intensity of 0.8 kV. The surface morphology of AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex was analyzed. The samples were mounted on a metallic base using double-sided adhesive tape vacuum-coated with gold.

2.4.5. Fourier-transform infrared spectroscopy

Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy of the AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex was recorded by a spectrometer (Perkin Elmer[®], Model Spectrum One). Each disc was prepared with 2 mg of sample in 200 mg of KBr. The scans were collected from 4000 to 600 cm^{-1} at ambient temperature.

2.4.6. ¹H Nuclear magnetic resonance spectroscopic

The ¹H NMR spectroscopy of AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex was obtained at 300 K with a Bruker[®] DPX-400 spectrometer at 200 MHz. Experiments were performed with samples diluted in DMSO-d₆.

2.4.7. Molecular modeling studies

The association of the AM molecule with methyl- β -CD was evaluated through *ab initio* calculations based on DFT (KOHN; SHAM, 1965). The calculations were performed using the SIESTA (Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousand of Atoms) code which executes self-consistent calculations by solving the Kohn-Sham equations (SOLER et al., 2002). In all calculations, were used the double-zeta basis set and the polarization function (DZP), with an energy shift of 0.05 eV for the numerical atomic orbitals (VENDRAME et al., 2013; FIGUEIREDO J. et al., 2016). To represent the charge density, the cutoff radius of 200 Ry was utilized for the integration grid in real space. The exchange and correlation potential was given by the local density approximation (LDA), according to the parameterization of Perdew and Zunger (1981). The geometry optimizations were performed with the total relaxation of all atoms of the methyl- β -CD, and the AM molecule with the convergence criterion on all atomic coordinates of 0.05 eV / Å.

The binding energies (E_{bin}) were calculated using the basis set superposition error (BSSE) (BOYS; BERNARDI, 1970). This correction is done by the counting method using "ghost" atoms, as the following equation (2):

$$E_{bin} = - [E_T (M\beta CD + AM) - E_T (M\beta CD_{ghost} + AM) - E_T (M\beta CD + AM_{ghost})] \quad (2)$$

where E_{bin} is the binding energy of the system, $E_T (M\beta CD + AM)$ is the total energy of the AM-methyl- β -CD inclusion complex, $E_T (M\beta CD_{ghost} + AM)$ is the total energy of the AM molecule and $(M\beta CD + AM_{ghost})$ is the total energy of the methyl- β -CD.

2.4.8. Preparation of immediate release tablets containing inclusion complex

Immediate release tablets containing AM-Methyl- β -CD inclusion complex were prepared by direct compression using a Riva[®] 10-station single punch rotary tablet compression machine (Piccola – B/10, Buenos Aires, Argentina). Previously, the excipients were weighed and sieved through a 355 μ m mesh to standardize particle size and were properly mixed using a TE-200 homogenizer (Tecnal[®]) during 15 minutes. Formulation codes (F1-F3) tested are presented in Table 1.

Table 1
Composition of matrix tablets of AM-Methyl- β -CD inclusion complex.

Ingredients	Milligrams per tablet (%/tablet)		
	F1	F2	F3
AM-Methyl- β -CD ^a	42.3 (14.1)	42.3 (14.1)	42.3 (14.1)
Lactose monohydrate	247.4 (82.47)	245.5 (81.83)	244.8 (81.6)
Maize Starch	3.8 (1.27)	3.8 (1.27)	2.6 (0.87)
Povidone K-30	1.2 (0.4)	3.0 (1.2)	5.15 (1.7)
Aerosil	2.6 (0.87)	2.6 (0.87)	2.6 (0.87)
Magnesium Stearate	2.6 (0.87)	2.6 (0.87)	2.6 (0.87)
Total quantity	300.0	300.0	300.0

^a AM-Methyl- β -CD inclusion complex in 1:1 M ratio equivalent to 0.010 g of drug.

2.5. Evaluation of tablets

The prepared tablets were evaluated for hardness, thickness, diameter, friability, weight variation and disintegration time (Farmacopeia Brasileira, 2010; USP, 2012). Hardness, thickness and diameter were measured using the PTB-311E (Pharma test[®]) hardness tester. The hardness was measured in terms of Newton (N). Friability was determined by using a friability tester PTF-10ER (Pharma test[®]). The weight variation was

measured with tablets selected at random in a SAE 200 balance (Bosch[®]). The disintegration time was determined with PTZ-E USP disintegration apparatus (Pharma test[®]) at $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$, in water. The drug content analyses were performed using the HPLC method (Rubim et al., 2015).

2.5.1. *In vitro* release experiments

Drug release studies from AM (10 mg) and immediate release tablets of the AM-Methyl- β -CD inclusion complex were performed using 900 mL dissolution medium (e.g. pH 1.2 acid buffer, pH 4.5 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer) and water at $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ using USP Apparatus 2 at 50 rpm. At a pre-specified time interval, samples (10 mL) were withdrawn with a syringe filter (pore size $0.45\text{ }\mu\text{m}$) and replaced with an equal volume of fresh medium to maintain a constant total volume. The drug content was determined using the HPLC method according to item 2.3.

3. Results and discussion

3.1. Phase solubility studies

Phase solubility studies are utilized to evaluate the differences of drug solubility with or without the presence of cyclodextrins. They also allow determining the stability constant (Ks) and the stoichiometry of complex formation (Lyra et al., 2010). The time necessary to achieve the thermodynamic equilibrium was 24 hours. The phase solubility of AM in aqueous solution can be seen in Fig. 1.

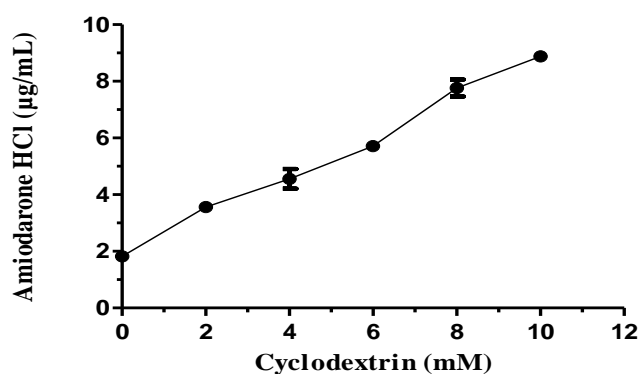


Fig. 1. Phase solubility of AM in the presence of Methyl- β -CD at 25 °C ($n = 3$).

As shown above we can observe an increased linear AM as a function of Methyl- β -CD concentration, indicating an A_L type phase solubility curve obtained, within the concentration range studied. The slope calculated was 0.717 which is less than 1. Since such a profile was

characterized by a slope of less than one, it was assumed that the solubility increase was due to the formation of a 1:1 molecular complex between AM and Methyl- β -CD (Higuchi and Connors, 1965; Liu et al., 2015). The K_s of the inclusion complex were calculated as 1473.3 M^{-1} from the linear plot of the phase solubility diagram.

3.2. Preparation of AM-Methyl- β -CD inclusion complex

The inclusion complex was obtained by the spray-drying process without any problems. The dried product obtained was white and odorless, which is a specific characteristic of lactose used as a drying adjunct. The AM content in the dried product was $99.52 \pm 1.08\%$, indicating that there was no degradation or loss of AM during the dehydration process. The performance of the drying process was evaluated, the result obtained was about 79.16%. This high value can be explained because of the presence of the cyclodextrin that resulted in low adherence of the powder to the spray-dryer wall, a similar result was found by Borghetti et al., 2009.

3.3. Characterization of the complexes

3.3.1. Specific surface area

The mathematical model BET was used to determine the SBET of the solid, knowing the volume of gas necessary to cover the solid surface (Brunauer et al., 1938). The BET surface areas of the pure drug and after the inclusion complex process were 0.6081 and $1.9418 \text{ m}^2/\text{g}$. As expected, the SBET of AM increased more than 3 times after the inclusion complex process when compared with the pure drug.

3.3.2. XRD analysis

The XRD patterns of AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex are illustrated in Fig. 2.

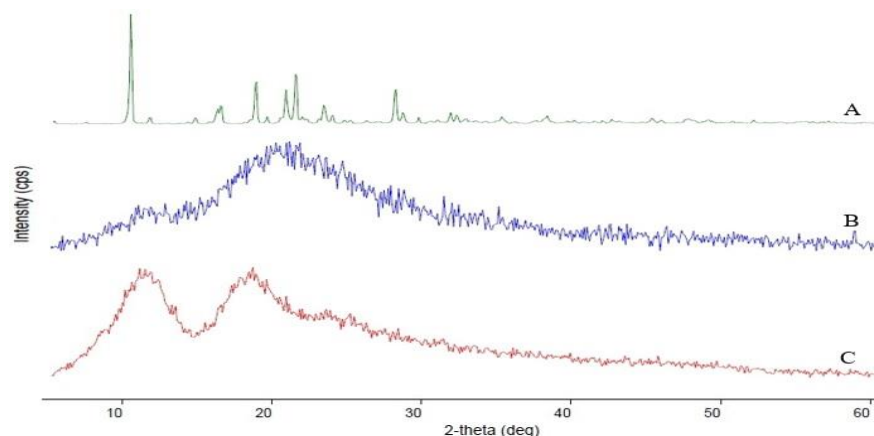


Fig. 2. X-ray powder diffraction spectra of AM (A), AM-Methyl- β -CD inclusion complex (B) and Methyl- β -CD (C).

The diffraction behavior of AM demonstrates its crystalline state, also exhibiting numerous high-intensity peaks, with the three highest intensity peaks at a diffraction angle of 2θ (10.22° , 18.68° and 23.18°), indicating the crystalline nature. As can be seen, Methyl- β -CD demonstrated the solid amorphous diffraction profile.

Comparing the diffraction pattern of AM with AM-Methyl- β -CD inclusion complex it was possible to observe a complete drug amorphization, thus indicating the transition from the crystalline to the amorphous state (Rao et al., 2010). This evaluation corroborates the results previously reported by Bankar and Mahatma, 2012, Paduraru et al., 2013 and Riekes et al., 2010, when the amorphization of the compounds after complexation with cyclodextrins was demonstrated.

3.3.3. Thermal analysis

The DSC curves are very useful tools to verify incompatibility between pharmaceutical excipients and several drugs and to characterize and evaluate the inclusion complexes, since the disappearance of endo or exothermic peaks of drugs is mostly an indication of the formation of these complexes (Riekes et al., 2010; Yoshida et al., 2011). The thermal behavior of the AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex can be seen in Fig. 3.

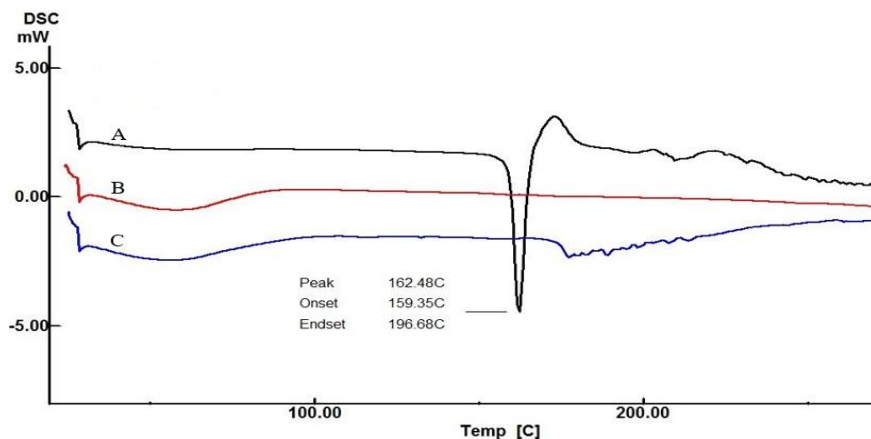


Fig. 3. DSC thermograms of: AM (A), Methyl- β -CD (B) and AM-Methyl- β -CD inclusion complex (C).

The DSC curves of AM revealed a single sharp endothermic peak around 162.5 °C, corresponding to the melting point of the AM ($\Delta H = -154.38$ J/g) and the Methyl- β -CD has a very broad peak with a maximum between 60 and 90 °C that can be attributed to the evaporation of water. Similar results were observed in other studies (Paduraru et al., 2013; Riekes et al., 2010).

It was clear that the melting point of AM disappeared when the inclusion complex by spray-drying was evaluated. This result may be related to the inclusion of the AM molecule in the Methyl- β -CD cavity replacing the previously bound water molecules (Mendes et al., 2016).

3.3.4. FT-IR spectroscopy

FT-IR is useful to identify several functional groups, and this technique is also widely used to research new active molecules. In this study, we use FT-IR to verify the existence of intermolecular interaction between AM and Methyl- β -CD in the solid state after the complexation process. The FT-IR spectrum of AM, Methyl- β -CD and AM-Methyl- β -CD inclusion complex can be seen in Fig. 4.

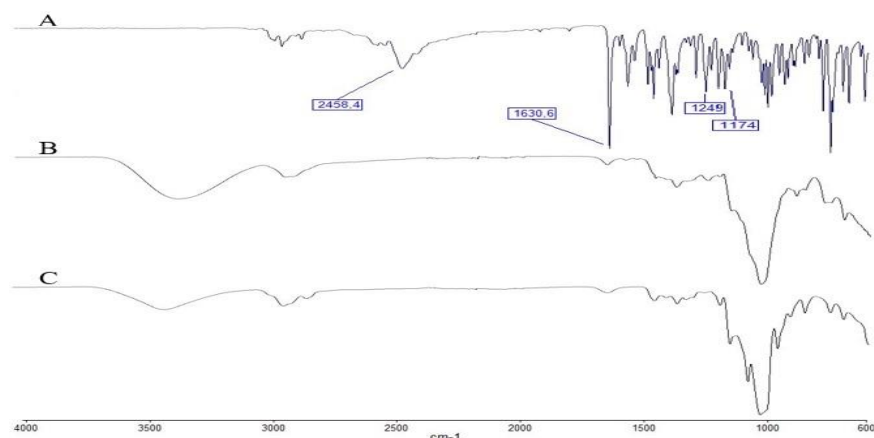


Fig. 4. FT-IR spectra of AM (A), AM-Methyl- β -CD inclusion complex (B) and Methyl- β -CD (C).

The FT-IR spectra of AM showed the presence of the following peaks: 1174, 1249, 1630.6 and 2458.4 cm^{-1} denoting stretching vibration of C-N, R-C-O-C-R, C=O and N-H⁺, respectively (Socrates, 1980; Khan et al., 2005), while the FT-IR spectra of Methyl- β -CD are characterized by intense bands at 3300-3500 and 2800-3000 due to O-H stretching vibration and R-CH₂-R, respectively (Schalley, 2007).

A major change was detected in a region of the FT-IR of AM-Methyl- β -CD inclusion complex and AM absorption peak at 2458.4 cm^{-1} was not observed. This suggests that the inclusion complex occurred on the N-H⁺ side. Therefore, it is presumed that the inclusion complex showed an interaction between AM and Methyl- β -CD by spray-drying process at the molecular level.

3.3.5. ¹H NMR analysis

The ¹H NMR spectroscopy is a useful tool for verification of stability, stoichiometry and geometry of the inclusion complex. In addition, it allows determining which parts of the chemical structure of the guest molecule are complexed with the cyclodextrins (Bouquet et al., 2007; Veiga et al., 2006). In general, after the complex is formed the chemical shift variations are small because the interaction between host and guest molecules involves noncovalent bonds (e.g. hydrogens bonds, Van der Waals forces and hydrophobic interactions) (Tang et al., 2015; Yuan et al., 2012). Fig. 5 shows the ¹H NMR spectra of AM, inclusion complex and Methyl- β -CD.

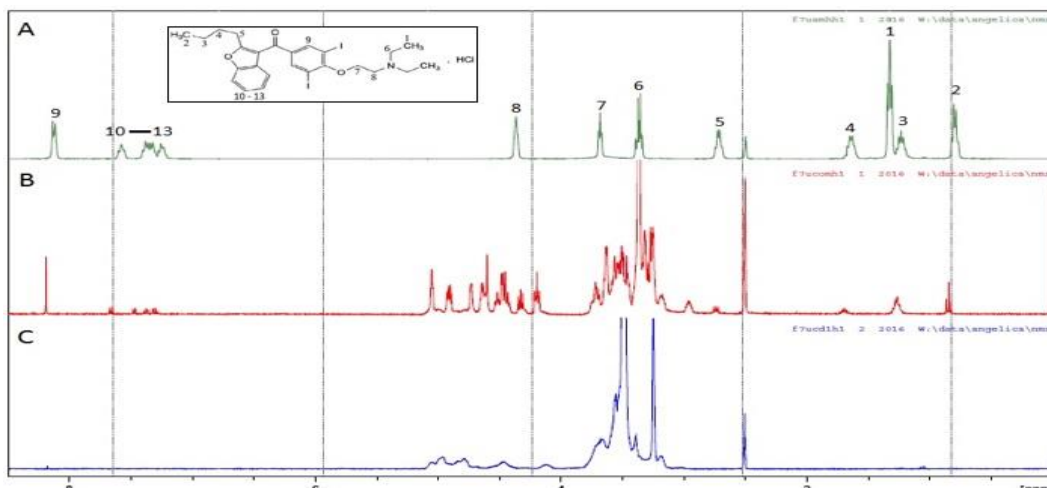


Fig. 5. ^1H NMR spectra of AM (A), AM-Methyl- β -CD inclusion complex (B) and Methyl- β -CD (C).

The proton displacements of AM are consistent with the results previously reported by (Jendrasiak et al., 1990). After formation of inclusion complex the absence of H-1 (1.661 ppm) and H-6 (3.376 ppm) was verified, thus a strong indication that the interaction of this lipophilic portion is located in the inner part of Methyl- β -CD molecular cavity, which was also confirmed by the results obtained after FT-IR spectroscopy. Table 2 shows the chemical shifts before and after inclusion complex.

Table 2

Variation of the ^1H NMR chemical shifts of AM before and after inclusion complex.

Proton of AM	Before inclusion complex	After inclusion complex
	δ (ppm)	δ (ppm)
1	1.661 (H-3)	CP
6	3.376 (H-2)	CP
2	0.807 (H-3)	0.850 (H-3)
3	1.271 (H-2)	1.275 (H-2)
4	1.661 (H-2)	1.699 (H-2)
5	2.737 (H-2)	2.962 (H-2)
7	3.692 (H-2)	4.198 (H-2)
8	4.374 (H-2)	4.332 (H-2)

CP – Complexed Protons

As expected, the ^1H NMR studies showed a downfield displacement (H-2, H-3, H-4, H-5 and H-7 protons) indicating that this guest molecule portion can be located in the outer part of the Methyl- β -CD molecular cavity. According to Ganza-Gonzalez and collaborators (1994) a downfield displacement is an environment of electronegative atoms.

3.3.6 Molecular modeling studies

To rationalize the experimental results of ^1H NMR described above, different configurations of AM molecule were complexed in the larger cavity of Methyl- β -CD through *ab initio* calculations. The most stable structures of the inclusion complexes for both extremities of the AM are shown in Fig. 6. The binding energies (calculated by equation (2)), charge transfers and the relevant interatomic distances for all configurations studied are shown in Table 3.

Initially we obtained different configurations of complexation considering the extremity of the AM molecule which contains the diethylamine group. The most stable configuration obtained with this approach was the AM-Methyl- β -CD-I with binding energy of 0.76 eV. No covalent bonds were observed, confirming that the interactions of the inclusion complex occur in a physical adsorption. The bond distances were between 2.00 Å ($\text{H}_{\text{M}\beta\text{CD}} - \text{H}_{\text{AM}}$) and 1.92 Å ($\text{H}_{\text{M}\beta\text{CD}} - \text{H}_{\text{AM}}$). We demonstrate that the nitrogen atom of AM is completely embedded into the Methyl- β -CD cavities. From the Mulliken population analysis, the charge transfers of the studied system show that the Methyl- β -CD behaves as an electron acceptor with a charge transfer of $0.08 e^-$ from AM to the Methyl- β -CD. This charge behavior is in accordance with the previous result of the literature (Figueiredo et al., 2016).

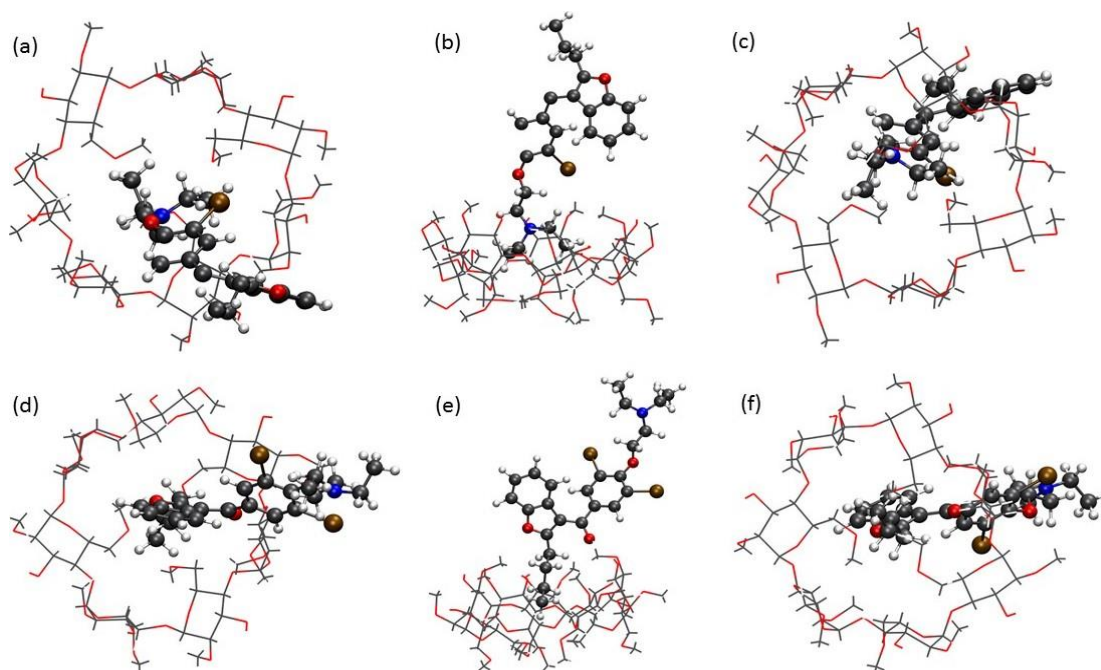


Fig. 6. Structural configurations of the inclusion complexes of AM with Methyl- β -CD with different orientations as obtained from *ab initio* calculation. (a) top, (b) side, (c) bottom views of the AM-Methyl- β -CD-I inclusion complex. (d) top, (e) side, (f) bottom views of the AM-Methyl- β -CD-II inclusion complex.

Secondly, we gradually approached the region of the butyl group in the larger cavity of Methyl- β -CD. The most stable configuration among those studied for this approach was the AM-Methyl- β -CD-II with binding energy of 0.71 eV. These binding energy values reveal a physical adsorption process. The bond distances were between 1.76 Å ($H_{M\beta CD} - O_{AM}$) and 1.91 Å ($H_{M\beta CD} - H_{AM}$). The charge transfers of the studied system show that Methyl- β -CD behaves as an electron acceptor with a charge transfer of 0.05 e^- from AM to the Methyl- β -CD.

Table 3

Results of smaller distances, binding energies and charge transfers for different configurations (positive values indicate that the Methyl- β -CD is an electron acceptor).

Configurations	Distance (Å)	E_{bin} (eV)	Δq (e^-)
AM-Methyl- β -CD-I	2.00 ($H_{M\beta CD} - H_{AM}$)	0.76	0.08
	1.92 ($H_{M\beta CD} - H_{AM}$)		
AM-Methyl- β -CD-II	1.76 ($H_{M\beta CD} - O_{AM}$)	0.71	0.05
	1.91 ($H_{M\beta CD} - H_{AM}$)		

E_{bin} – Energy binding; Δq – Charger transfers

The results by DFT showed clearly that the orientation of the diethylamine group is more favorable than the orientation of the butyl group for the complexation in the inner part of cyclodextrin and the results are consistent with the 1H NMR observations.

3.3.7. Scanning electron microscopy

SEM is the main technique to evaluate the morphological aspects of polymers, solid dispersions, drugs, cyclodextrins and inclusion complexes (Naidu et al., 2004). Fig. 7 shows the SEM images of AM, Methyl- β -CD and the inclusion complex.

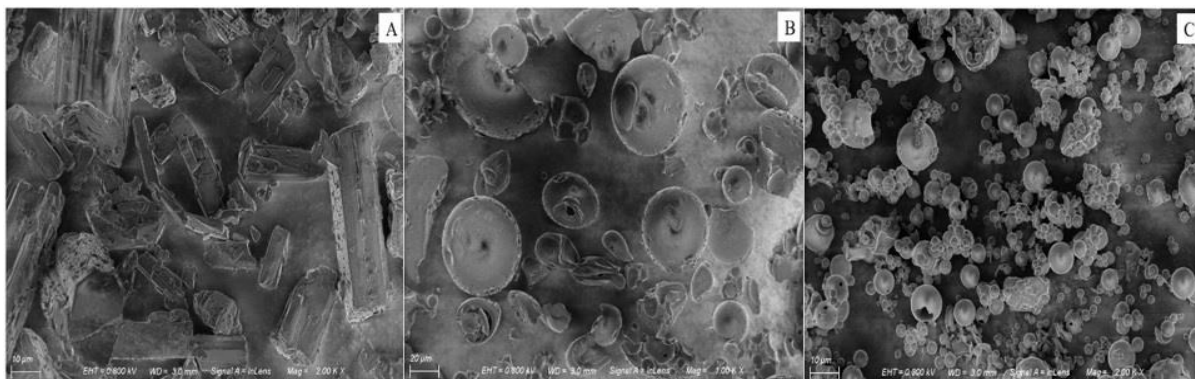


Fig. 7. SEM photographs of AM (A), Methyl- β -CD (B); and AM-Methyl- β -CD inclusion complex (C).

The micrograph of the pure AM shows a crystal morphology characterized by irregular shapes, which is in accordance with the X-ray analysis that showed the crystalline nature of AM. On the other hand, Methyl- β -CD exists in some regular, amorphous and spherical particles with cavity structures. A drastic change in the drug morphology can be observed in the AM-Methyl- β -CD inclusion complex, revealing an apparent interaction in the solid state. The results for the dried products prepared from inclusion complex were similar to those found in Freitas et al., 2012 and Lopodota et al., 2016, on the drying of olanzapine- β -cyclodextrin and celecoxib-methyl- β -cyclodextrin inclusion complex, respectively. These results, are according to results obtained by others evaluations (i.e. DSC, X-ray powder and ^1H NMR) thus corroborating the formation of an amorphous system.

3.4. Evaluation of immediate release tablets

As can be seen in Table 4, all the formulations approved in drug content, weight variation test and good thickness and diameter values were achieved.

Table 4
Physical properties and drug content of AM-Methyl- β -CD inclusion complex tablets.

Parameter	Specification	F1	F2	F3
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Weight variation ^a (mg)	$\pm 5\%$	298.71 \pm 0.18	307.9 \pm 0.30	298.03 \pm 0.19
Hardness ^b (N)	-	13.7 \pm 1.57	61.5 \pm 2.43	128.3 \pm 4.11
Thickness ^b (mm)	-	3.77 \pm 0.06	3.62 \pm 0.03	3.90 \pm 0.07
Diameter ^b (mm)	-	9.03 \pm 0.03	8.87 \pm 0.05	8.98 \pm 0.02
Friability ^a	< 1.5%	>1.5	0.34	0.67
Disintegration time ^b	< 30 minutes	0.47	1.16	3.57
Drug content	95.0 – 105.0%	99.17 \pm 0.81	99.11 \pm 1.00	101.29 \pm 2.31

^a All values are expressed as mean \pm SD, $n = 20$; ^b All values are expressed as mean \pm SD, $n = 6$

As expected, a linear relationship occurred between hardness properties and disintegration time for all formulations (Shankarrao et al., 2010). The F2 and F3 formulations showed higher hardness values than the F1 formulation. This may be due to the increase in the contact area among powder particles, leading to a slow disintegration time (Raghavendra et al., 2009). The F1 formulation did not pass the friability test, three tablets broke and they

showed more than 1.5% of friability. The implication of this is that tablets have a very quick disintegration time.

3.4.1 *In vitro* dissolution study

Figure 8-9 shows that dissolution profiles of tablets manufactured with F2 and F3 formulations were evaluated using four dissolution mediums simulating the gastric and intestinal fluids.

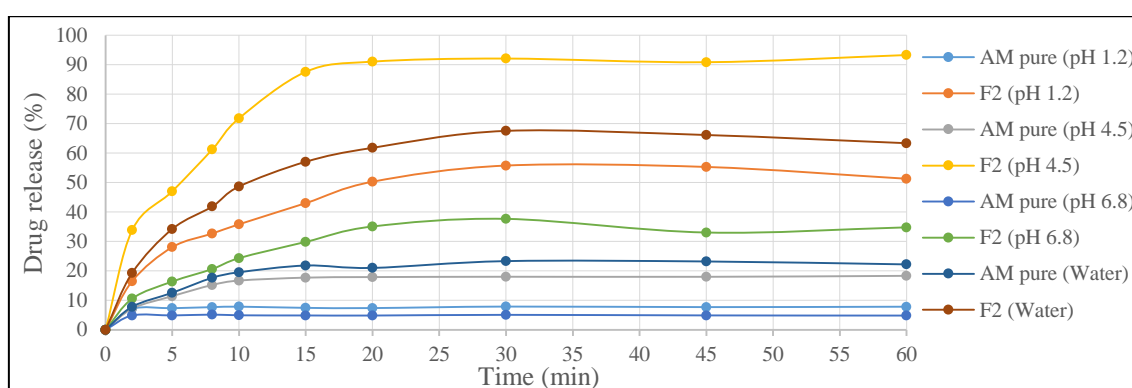


Fig. 8. Dissolution profile obtained with AM powder and AM-Methyl- β -CD inclusion complex from F2 formulation.

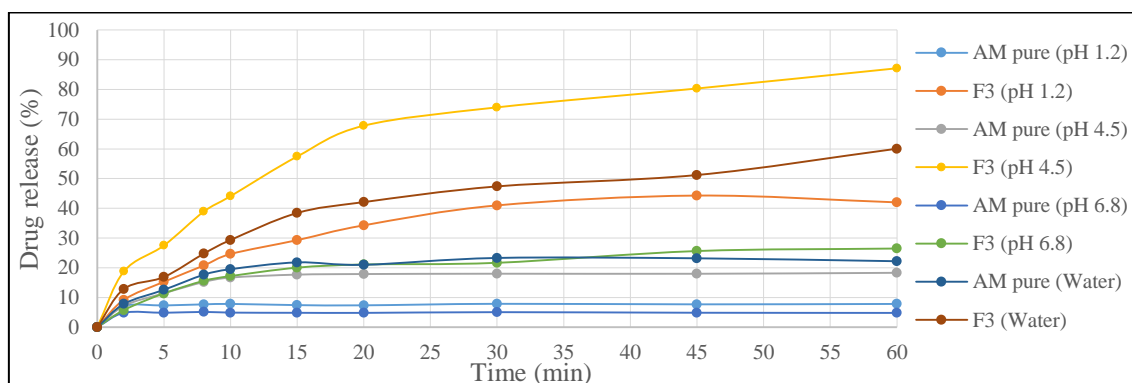


Fig. 9. Dissolution profile obtained with AM powder and AM-Methyl- β -CD inclusion complex from F3 formulation.

For drugs belonging to BCS Class 2, the dissolution rate is a limiting step for the absorption process. Recent developments with cyclodextrins have been utilized by formulating scientists for the development of oral solid products for the purpose of improving drug solubility (Aly et al., 2003; Goudanavar et al., 2011; Shankarrao et al., 2010; Syukri et al., 2015).

As expected, the dissolution rate of pure AM was very slow in the mediums evaluated, with only 22.20%, 7.83%, 18.31% and 4.82% of drug released in water, pH 1.2 acid buffer,

pH 4.5 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer, respectively after 60 minutes. These results showed that solubility of drug depends on the pH value due to the presence of an ionizable ter-amine (Paduraru et al., 2013).

It is quite evident that the inclusion complex by spray drying method improved the drug solubility in all mediums for both formulations evaluated. The highest dissolution rates for F2 and F3 formulations were achieved by pH 4.5 acetate buffer, the formulations release, within 60 minutes, 93.31% and 87.14%, respectively. Both formulations exhibited immediate drug release (>75% dissolved in 45 minutes) complying with the current resolution (Anvisa, 2010).

The rapid drug release for both formulations was consistent with the increased solubility of AM shown in phase solubility studies. Moreover, the higher amorphization of drug after complexing and increase of specific surface area, contributed to the improved drug dissolution rate.

4. Conclusions

The aqueous solubility and dissolution rate of immediate release tablets containing AM can be increased in all gastrointestinal fluids evaluated by complexation with Methyl- β -CD using the spray-drying process. The SBET, XRD, DSC, SEM, FT-IR and ¹H NMR results clearly confirmed the formation of the inclusion complex. Molecular modeling studies support the formation of stable molecular inclusion complex between drug and Methyl- β -CD. Thus, the present work showed that Methyl- β -CD can be used as excipient for the production of inclusion complex with poorly soluble drugs and be a promising strategy for developing novel dosage forms

Acknowledgement

We thank Profs. Marcos Segatto and Raphael Nicolay (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil) for the DSC and SEM analysis.

References

Aly, A.M., Qato, M.K., Ahmad, M.O., 2003. Enhancement of the Dissolution Rate and Bioavailability of Glipizide through Cyclodextrin Inclusion Complex. *Pharm. Technol.* 54-62.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 31 de 11 de agosto de 2010. Dispõe Sobre a Realização de Estudos e Equivalência Farmacêutica e de perfil de Dissolução Comparativo.

Bankar, P.V., Mahatma, O.P., 2012. Improved dissolution rate of leflunomide using hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexation by Freeze-Drying Method. *Int. J. Drug Deliv.* 4, 498-506.

Borghetti, G.S., Lula, I.S., Sinisterra, R.D., Bassani, V.L., 2009. Quercetin/ β -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. *Pharm. Sci. Tech.* 10, 235-242.

Bouquet, W.I., Ceelen, W., Fritzing, B., Pattyn, P., Peeters, M., Remon, J.P., Vervaet, C., 2007. Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation and stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 391-7.

Boys, S.F., Bernardi, F., 1970. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* 19, 553-566.

Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309-319.

Cushing, D.J., Kowey, P.R., Cooper, W.D., Wassey, B.W., Gralinski, M.R., Lipicky, R.J., 2009. PM101: A cyclodextrin-based intravenous formulation of amiodarone devoid of adverse hemodynamic effects. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 167-172.

Davis, M.E., Brewster, M.E., 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 3, 1023–1035.

Eghrary, S.H., Zarghami, R., Martinez, F., Jouyban, A., 2012. Solubility of 2-butyl-3-benzofuranyl 4-(2-(diethylamino)ethoxy-3,5-diiodophenyl ketone hydrochloride (Amiodarone HCl) in ethanol + water and *N*-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures at various temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* 57, 1544-1550.

Farmacopeia Brasileira. 2010, 5 ed. Fiocruz, Brasília.

Figueiredo, J., Silva, L.B., Pontes, R.B., Zanella, I., Fagan, S.B., 2016. Interaction of α -Tocopherol with α - and β -Cyclodextrins: A First-Principles Investigation. *J. Nanopharmaceutics Drug Delivery.* 3, 70-77.

Freitas, M.R., Rolim, L.A., Soares, M. F., Rolim-Neto, P.J., Albuquerque, M.M., Soares-Sobrinho, J.L., 2012. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. *Carbohydr Polym.* 89, 1095-1100.

Ganza-Gonzalez, A., Vila-Jato, J.L., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco-Méndez, J., 1994. A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 106, 179-185.

Goudanavar, P., Shah, S.H., Hiremath, D., 2011. Development and Characterization of Lamotrigine Orodispersible Tablets: Inclusion Complex with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 208-214.

Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Phase Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* 4, 117-122.

Jendrasiak, G.L., McIntosh, T.J., Ribeiro, A., Porter, R.S., 1990. Amiodarone-liposome interaction: a multinuclear NMR and X-ray diffraction study. *BBA-Biomembranes*. 1024, 19-31.

Khan, M.A., Kumar, S., Jayachandran, J., Vartak, S.V., Bhartiya, A., Sinha, S., 2005. Validation of a Stability Indicating LC Method for Amiodarone HCL and Related Substances. *Chromatographia*. 61, 599-607.

Kohn, W., Sham, L.J., 1965. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140, 133.

Lafuente-Lafuente, C., Alvarez, J.C., Leenhardt, A., Mouly, S., Extramiana, F., Caulin, C., Funck-Brentano, C., Bergmann, J., 2009. Amiodarone concentrations in plasma and fat tissue during chronic treatment and related toxicity. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 67, 511–519.

Libersa, C.C., Brique, S.A., Motte, K.B., Caron, J.F., Guedon-Moreau, L.M., Humbert, L., Vincent, A., Devos, P., Lhermitte, M.A., 2000. Dramatic inhibition of amiodarone metabolism induced by grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 373–8.

Liu, M., Chen, A., Wang, Y., Wang, C., Wang, B., Sun, D., 2015. Improved solubility and stability of 7-hydroxy-4-methylcoumarin at different temperatures and pH values through complexation with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin. *Food chem.* 168, 270-275.

Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85, 1017-1025.

Lopedota, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Denora, N., Iacobazzi, R.M., Perrone, M., Fanizza, E., Mastrodonato, M., Mentino, D., Lopalco, A., Depalo, N., Franco, M., 2016. Spray Dried Chitosan Microparticles for Intravesical Delivery of Celecoxib: Preparation and Characterization. *Pharm. Res.* 9, 2195-2208.

Loukas, Y.L., Jayasekera, P., Gregoriadis, G., 1995. Novel liposome-based multicomponent systems for the protection of photolabile agents. *Int. J. Pharm.* 117, 85-94.

Lyra, M.A.M., Alves, L.D.S., Fontes, D.A.F., Soares-Sobrinho, J.L., Rolim-Neto, P.J., 2010. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *J. Basic Appl. Sci. Pharma.* 31, 117-124.

Marques, H.C., Hadgraft, J., Kellaway, I., 1990. Studies of cyclodextrin inclusion complex I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *Int. J. Pharm.* 63, 259-266.

Mendes, C., Buttchevitz, A., Kruger, J.H., Kratz, J.M., Simões, C.M.O., Benedet, P.O., Oliveira, P.R., Silva, M.A.S., 2016. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and β -cyclodextrin: Physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 83, 71-78.

Naidu, N.B., Chowdary, K.P., Murthy, K.V., Satyanarayana, V., Hayman, A.R., Becket, G., 2004. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. *J. Pharmaceut. Biomed.* 35, 75–86.

Paduraru, O.M., Bosînceanu, A., Tântaru, G., Vasile, C., 2013. Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Solubility of an Antiarrhythmic Agent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 2174-2181.

Perdew, J.P., Zunger, A., 1981. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. *Phys. Rev. Lett.* 23, 5048-5079.

Pharmacopoeia, B., 2012. London: The Stationary Office. 137-138.

Raghavendra, R.N.G., Kota, R., Setty, C.M., Purushotham, R.K., 2009. Formulation and Evaluation of Fast Dissolving Chlorthalidone Tablets. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 1, 79-87.

Rao, M., Mandage, Y., Thanki, K., Bhise, S., 2010. Dissolution Improvement of Simvastatin by Surface Solid Dispersion Technology. *Dissolut. Techno.* 17, 27-34.

Riekes, M.K., Tagliari, M.P., Granada, A., Kuminek, G., Silva, M.A.S., Stulzer, H.K., 2010. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. *Mater. Sci. Eng. C.* 30, 1008-1013.

Rubim, A.M., Rubenick, J.B., Gregolin, E., Laporta, L.V., Leitenberg, R., Rolim, C.M.B., 2015. Amiodarone Hydrochloride: enhancement of solubility and dissolution rate by solid dispersion technique. *Braz. J. Pharm. Sci.* 51, 957-966.

Schalley, C., 2007. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 817-854

Shankarrao, K.A., Mahadeo, G.D., Balavantrao, K.P., 2010. Formulation and *In-vitro* Evaluation of Orally Disintegrating Tablets of Olanzapine-2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex. *Iran. J. Pharm. Res.* 9, 335-347.

Singh, B.N., 1983. Amiodarone: Historical development and pharmacologic profile. *Am Heart J.* 106, 788–797.

Socrates, G., 1980. *Infrared Characteristics Group Frequencies*. John Wiley & Sons, New York, pp. 54, 55, 62, 69.

Soler, J.M., Artacho, E., Gale, J.D., García, A., Junquera, J., Ordejón, P., Sánchez-Portal, D., 2002. The SIESTA method for ab-initio order-N materials simulation. *J. Phys. Condens. Matter.* 14, 2745-2779.

Syukri, Y., Fernanda, L., Utami, F.R., Qiftayati, I., Kusuma, A.P., Istikaharah, R., 2015. Preparation and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes oral tablets containing poorly water soluble glimepiride using freeze drying method. *Indonesian. J. Pharm.* 26, 71–77.

Swathi, P., Narender, B.R., 2015. Formulation and Evaluation of Solid Dispersion Based Fast Dissolving Tablet of Amiodarone. *Int. J. Pharm. Technol.* 7, 8450-8467.

Tang, P., Li, S., Wang, L., Yang, H., Yan, J., Li, H., 2015. Inclusion complexes of chlorzoxazone with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. *Carboh. Polymers.*, 131, 297-305.

Taupitz, T., Dressman, J.B., Buchanan, C.M., Klein, S., 2013. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: Itraconazole. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 378–387.

Uekama, K., 2004. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharma. Bull.* 52, 900-915.

USP, 2012. United States Pharmacopoeia, USP. 35 ed. USP Convention Inc., Rockville.

Veiga, F.J.B., Pecorelli, C.C.M.F., Ribeiro, S.S.L., 2006. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Editora Minerva Coimbra. pp.140-143.

Vendrame, L.F.O., Michelon, E., Zanella, I., Fagan, S.B., Mota, R., 2013. First Principles Simulations of Zidovudine (AZT) Molecules Interacting with Carbon Nanostructures. *J. Comput. Theor. Nanosci.*, 10, 313-317.

Yao, Y., Xie, Y., Hong, C., Li, G., Shen, H., Ji, G., 2014. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. *Carbohydr Polym.* 110, 329–337.

Yoshida, M.I., Gomes, E.C.L., Soares, C.D.V., Oliveira, M.A., 2011. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Amiodarone Hydrochloride under isothermal conditions. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 37, 638-647.

Yuan, C., Jin, Z., Xu, Z., 2012. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ^1H NMR and molecular modeling studies. *Carbohydr. Polym.* 89, 492-496.

No presente trabalho foram utilizadas duas abordagens tecnológicas para aumentar a solubilidade do AMH: formação de dispersões sólidas e de complexos de inclusão.

Inicialmente as dispersões sólidas utilizando polímeros hidrofílicos (polietilenoglicóis PEG 1500, 4000 e 6000) foram preparadas pelos métodos de amassamento (*Kneading method*), método de fusão (*Fusion method*) e mistura física (*Physical mixture*), onde os resultados e a discussão estão apresentados no Capítulo 6.

Posteriormente, a formação dos complexos de inclusão contendo diferentes ciclodextrinas (β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) foram realizadas a partir dos métodos de coevaporação (*Coevaporation*), secagem por aspersão (*Spray-drying*), processo de liofilização (*Freeze-drying*) e mistura física (*Physical mixture*), estando estes resultados e a discussão apresentados no Capítulo 7.

A última parte deste trabalho, se deu a partir da avaliação dos resultados obtidos pelas abordagens citadas acima, sendo que para o desenvolvimento farmacotécnico e produção dos comprimidos de liberação imediata contendo 10 mg de AMH, foram utilizados os complexos de inclusão entre o AMH e a metil- β -ciclodextrina pelo método de *spray-drying*, devido as boas características obtidas nos estudos de pré-formulação: propriedades de fluxo do pó (Índice de Carr = 14,0% e ângulo de repouso = 32°), propriedades termodinâmicas e constante de estabilidade do complexo, estando os resultados e a discussão deste trabalho apresentados no Capítulo 8.

A fraca capacidade de uma molécula ativa entrar em solução muitas vezes é a limitação mais importante para sua taxa de absorção global do que sua capacidade de penetrar a mucosa intestinal. Para fármacos que apresentam uma facilidade para penetrar esta mucosa, os seus níveis séricos estarão relacionados com o tempo requerido para forma farmacêutica liberar o seu conteúdo e haver uma completa dissolução. De acordo com o conceito biofarmacêutico, moléculas com baixa solubilidade apresentam tempo de dissolução maior que o tempo de trânsito gastrointestinal, passando de forma intacta pelos principais sítios de absorção levando a uma biodisponibilidade variável ou incompleta (HORTER; DRESSMAN, 1997).

As análises biofarmacotécnicas *in vitro* possibilitam a verificação de informações a respeito das propriedades físicas e físico-químicas dos fármacos, formas farmacêuticas e a influência que diferentes excipientes promovem na cinética de liberação da molécula ativa. Os ensaios de dissolução *in vitro* são os principais métodos de avaliação biofarmacotécnica, uma vez que o processo de dissolução é o fator limitante para absorção de muitos fármacos (DRESSMAN et al., 1993).

A absorção de moléculas ativas a partir da administração oral é dependente de suas propriedades intrínsecas como tamanho da partícula, coeficiente de partição, solubilidade, velocidade de dissolução, tipo do cristal, pKa, presença de grupos facilmente ionizáveis, entre outras, assim como o modo de liberação a partir da formulação (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

A teoria mais aceita para avaliação da taxa de dissolução de uma partícula, está amparada na equação proposta por Nernst e Brunner (1904) (Equação 1).

$$\boxed{\frac{dC}{dt} = K \frac{DS}{Vh} (C_s - C_t)}$$

Equação 1

Onde, dC/dt é a taxa de dissolução, coeficiente de dissolução (K), coeficiente de difusão da partícula (D), área superficial da partícula (S), espessura da camada de difusão (h), volume do meio de dissolução (V), solubilidade de saturação do fármaco (C_s) e a concentração da partícula em tempo t (C_t).

De acordo com a equação 1, pode-se verificar diferentes propriedades que a partir de algumas alterações, a taxa de dissolução será afetada. Entre estas propriedades podemos citar: a redução do tamanho da partícula, que aumentará a área superficial que entrará em contato com os fluidos fisiológicos; o aumento da capacidade de molhabilidade da partícula, que ocasionará uma redução da espessura da camada de difusão e mais rapidamente a partícula entrará em contato com o seio da solução (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

A cada ano, a síntese de moléculas ativas tem sido cada vez mais retraída, uma vez que estas moléculas apresentam baixa solubilidade aquosa dificultando, assim as suas biodisponibilidades. Dê um modo geral estes fármacos pertencem à classe II do SCB, sendo esta classe caracterizada por apresentar baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade intestinal (FRIESEN et al., 2008).

O desenvolvimento de formulações contendo fármacos classe II para administração oral e que estas apresentem uma boa resposta biofarmacêutica, representa um dos mais importantes obstáculos para indústria farmacêutica como para pesquisadores (LEUNER; DRESSMAN, 2000). Na tentativa de transpor estes obstáculos diferentes estratégias têm sido desenvolvidas, entre elas: a alteração da forma base do fármaco para forma de um sal, a co-precipitação, a nanotecnologia, a incorporação de agentes solubilizantes, a redução do

tamanho de partícula, a alteração do tipo de cristal, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas e de dispersão com carreadores hidrofílicos (ALVES et al., 2014; CHOW et al., 1995; FLEGO; LOVRECICH; RUBESSA, 1998; HABIB; ATTIA, 1985; JABLAN; SZALONTAI; JUG, 2012; PATEL et al., 2012; VEMULA; LAGISHETTY; LINGALA, 2010).

Inicialmente, um método utilizando a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) foi desenvolvido para avaliar o teor e quantidade dissolvida do AMH a partir das diferentes formulações (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

Previamente ao seu desenvolvimento foram realizadas pesquisas na literatura com a finalidade de se obter informações a respeito da molécula do fármaco em questão, assim como verificar suas propriedades físico-químicas, estabilidade e compatibilidade com solventes orgânicos (ELHASI; ASTANEH; LAVASANIFAR, 2007; KHAN et al., 2005; LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2009; MUHAMMAD et al., 2008). Após a utilização de diferentes tipos de fases móveis, diluentes e fases estacionárias, o método foi validado de acordo com as condições mencionadas no Capítulo 5. O método por CLAE validado demonstrou ser adequado para o objetivo proposto apresentando linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez podendo ser utilizado para determinação do AMH em DS e CI durante a execução do trabalho.

A dissolução de fármacos, especialmente aqueles de baixa solubilidade, classe II e IV do SCB, pode ser influenciada devido ao pH e volume dos líquidos (suco gástrico, sais biliares e líquidos intestinais) encontrados durante o percurso no trato gastrointestinal (TGI), pelo efeito surfactante dos sais biliares e pela presença de alimentos, sendo a dissolução e a permeabilidade de um fármaco são fatores chave para sua absorção e posterior eficácia clínica (DRESSMAN et al., 1993; LIPKA; AMIDON, 1999).

A solubilidade do AMH foi testada em tampão ácido clorídrico pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água. Em tampão fosfato pH 6,8 houve uma menor solubilidade do AMH, uma vez que, em soluções que apresentam o pH acima do pKa do fármaco (6,56) as moléculas estariam predominantemente em suas formas não ionizadas. Ao utilizar meios de dissolução com valores de pH inferiores ao pKa do fármaco, tampão ácido pH 1,2, tampão pH 4,5 e água destilada, ocorreu uma maior ionização do grupo amina presente na cadeia lateral da molécula facilitando assim sua solubilidade nestes meios.

Os estudos de solubilidade de fases foram realizados em diferentes temperaturas de acordo com Higuchi e Connors (1965). A partir deste estudo foi possível verificar os efeitos que os carreadores ou agentes complexantes promoveram em relação a solubilidade da

molécula hóspede, permitindo assim obter dados relacionados a constante de estabilidade (K_c), a estequiometria da formação dos complexos e parâmetros termodinâmicos (GUEDES et al., 2008; LYRA et al., 2010).

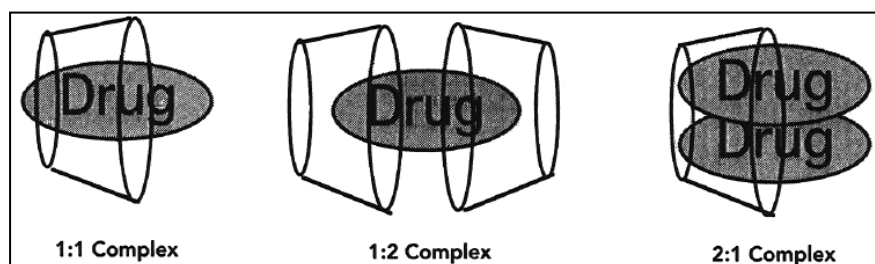
Com a finalidade de verificar a máxima solubilidade do AMH foram utilizados um intervalo de 0,01% a 1,5% (p/v) para os polímeros PEG 1500, 4000 e 6000 e 0 mM a 10 mM para as ciclodextrinas. Para a concentração mais alta de cada carreador e agente complexante, 1,5% e 10 mM, respectivamente, obteve-se um aumento da solubilidade aquosa em torno de 1,07; 1,31 e 5,72 vezes para PEG 1500, 4000 e 6000 respectivamente a 25 °C e 1,25; 1,58 e 3,51 vezes respectivamente a 37 °C e 7, 14 e 9 vezes para β -CD, Metil- β -CD e HP- β -CD respectivamente a 25 °C e 4, 8 e 5 vezes respectivamente a 37 °C. A solubilidade aquosa do AMH puro encontrada foi de 0,2815 e 0,4808 mg/mL a 25 °C e 37 °C respectivamente, resultados estes muito próximos aos encontrados por Amidon e colaboradores (1995) e Eghrary e colaboradores (2012).

A maior solubilidade do AMH foi verificada com o PEG 6000, sendo devido a formação de uma dispersão mais homogênea quando comparada com as outras dispersões produzidas com PEG 1500 e 4000, também pode ser atribuída devido a uma maior viscosidade promovida por este polímero, evitando assim a precipitação do AMH antes do processo de dissolução (ASKER; WHITWORTH, 1975). Em relação a máxima solubilidade do AMH quando em contato com as ciclodextrinas, um maior valor foi obtido com a Metil- β -CD para as duas temperaturas analisadas, sendo este resultado explicado devido principalmente as propriedades termodinâmicas do sistema que serão abordadas a seguir.

Os estudos de solubilidade de fases foram construídos a partir da relação entre a quantidade dissolvida do fármaco *versus* concentração de cada carreador. Uma clara relação de linearidade foi observada entre o aumento na solubilidade do AMH e a concentração do PEG 6000 e das ciclodextrinas, caracterizando assim os diagramas do tipo A_L . Estes diagramas podem ter classificação em duas categorias: tipo A e tipo B. Os diagramas tipo A (A_L , A_P e A_N) indicam a formação de complexos solúveis, por outro lado, os diagramas tipo B (B_S e B_I) indicam formação de complexos com baixa solubilidade (HIGUCHI; CONNORS, 1965). Em estudos utilizando o AMH, Riekes e colaboradores (2010), realizaram a complexação com a β -ciclodextrina em concentrações entre 2 e 16 mM, após a avaliação do diagrama, o mesmo foi classificado como tipo A_L e Paduraru e colaboradores, 2013 utilizaram a HP- β -CD como carreador nas concentrações de 3×10^{-3} e 15×10^{-3} M, sendo obtido um diagrama de igual perfil.

Um fator limitante para o sucesso da complexação entre moléculas hóspedes e ciclodextrinas é a estequiometria dos complexos, geralmente formam-se complexos do tipo 1:1, 1:2 ou 2:1, conforme demonstrado na figura 9.1 (DAVIS; BREWSTER, 2004).

Figura 9.1 - Possíveis variações dos complexos entre molécula hóspede e ciclodextrinas (THOMPSON, 1997).



A partir dos valores de *slopes* obtidos, 0,0041, 0,051 e 0,8308 a 25 °C e 0,1102, 0,2449 e 0,6434 a 37 °C para os polímeros PEG 1500, 4000 e 6000 respectivamente e 0,009, 0,008 e 0,011 a 25 °C e 0,015, 0,013 e 0,018 a 37 °C para β -ciclodextrina, Metil- β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina respectivamente, foi possível inferir a estequiometria dos complexos formados, sendo estes do tipo 1:1 (fármaco : carreador).

O uso de polímeros hidrofílicos para formação de dispersões sólidas tem sido frequentemente utilizado como uma ferramenta útil no aumento da solubilidade de moléculas ativas. Em estudo realizado por Adeli (2014) o fármaco modelo foi a azitromicina, fármaco este pertencente a classe II do SCB. Neste estudo foram preparadas dispersões sólidas binárias (fármaco + carreadores) contendo PEG 6000, sorbitol e poloxamer e ternárias (dispersão de fármaco + carreador e lauril sulfato de sódio), utilizando a técnica de fluido supercrítico. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar uma melhor solubilidade do fármaco assim como partículas mais esféricas e amorfas foram visualizadas.

Outro excipiente que está sendo muito utilizado para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos são as ciclodextrinas, uma vez que estas possuem a capacidade de aumentar a estabilidade e solubilidade de fármacos pouco solúveis, reduzir irritações gástrica, dérmica ou ocular, reduzir odores e sabores desagradáveis em formulações líquidas, aumentar a estabilidade térmica de compostos voláteis, além de reduzir a sua volatilidade (GUEDES et al., 2008).

Jagdale e colaboradores (2012) produziram comprimidos por compressão direta contendo nifedipino complexado com β -ciclodextrina através do método de liofilização. Estas

amostras apresentaram uma solubilidade aquosa 395,4% maior que o fármaco puro e, conseqüentemente, uma taxa de dissolução mais rápida devido ao complexo formado. Em 2015, Tang e colaboradores publicaram um artigo onde a molécula alvo foi a clorzoxazona. Esta foi complexada com β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina através do método de liofilização. A partir dos resultados dos testes de dissolução ficou claro o aumento significativo da solubilidade do fármaco complexado com HP- β -ciclodextrina. Outra avaliação importante realizada pelos autores foi em relação ao potencial citotóxico, dose dependente, por parte da clorzoxazona em hepatócitos humanos. Após a avaliação da viabilidade celular pela técnica do (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina) (MTT), houve uma redução da toxicidade do fármaco quando complexado com as ciclodextrinas.

Diversos são os fatores que influenciam a formação dos complexos de inclusão entre ciclodextrinas e moléculas hidrofóbicas. A cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é propícia para acomodar a parte mais apolar da molécula alvo em solução, ligações covalentes são formadas e rompidas rapidamente durante o processo, sendo que os complexos estão continuamente sendo formados e dissociados (STELLA et al., 1999). Fatores como a forma, tamanho e polaridade da molécula hóspede, assim como a compatibilidade geométrica com a cavidade da ciclodextrina podem interferir no processo. A formação do complexo se dá através da substituição de moléculas de água por moléculas hóspedes adequadas alterando propriedades termodinâmicas como entalpia, entropia e energia total do sistema (SZEJTLI, 1998). O equilíbrio termodinâmico entre o complexo formado e as moléculas no estado livre pode ser mensurado através da constante de estabilidade (K_c) (LOFTSSON; MÁSSON; SIGURJÓNSDÓTTIR, 1999).

A partir dos resultados obtidos podemos observar altos valores da K_c para todos os complexos de inclusão formados, caracterizando assim uma boa interação entre o AMH e as diferentes ciclodextrinas. A dependência entre a K_c e a temperatura foi observado nestes estudos, uma vez que para temperaturas de 37 °C os valores encontrados foram todos menores que a 25 °C, fato este, pode ser explicado devido a maior facilidade para ocorrer a dissociação do complexo resultando em uma maior concentração da molécula livre em maiores temperaturas (BEKERS et al., 1991; RAMA et al., 2006).

A K_c geralmente apresenta valores entre 0 e 10^5 M^{-1} , de acordo com Miller e colaboradores (2007) valores de K_c abaixo de 100 indicam uma fraca afinidade entre a molécula hóspede e a ciclodextrina, enquanto que valores elevados, indicam uma forte ligação

entre o complexo, o que reduz significativamente a sua dissociação afetando diretamente a biodisponibilidade (CHALLA, 2005; STELLA; RAJEWSKI, 1997).

Durante o processo de complexação envolvendo ciclodextrinas e formação de dispersões sólidas com polímeros hidrofílicos, alterações das energias nas ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre a molécula hóspede e o carreador, são mudanças que influenciam os parâmetros termodinâmicos dos sistemas. Os principais parâmetros avaliados para caracterizar se os sistemas são favoráveis ou não à solubilização das moléculas nas soluções contendo os carreadores são a energia livre de Gibbs (ΔG_T) de transferência e mudanças nos valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) dos sistemas (PATEL et al., 2008).

Para as dispersões e complexos de inclusão formados os valores de ΔG_T foram todos negativos, indicando assim que a formação dos sistemas é de forma espontânea e favorável à incorporação e dispersão do fármaco. Após a formação dos complexos de inclusão, para todas as ciclodextrinas avaliadas, os valores encontrados de (ΔH) foram negativos, sugerindo assim que as interações entre o AMH e as ciclodextrinas foram a partir de um processo exotérmico com interações de baixa energia. Os valores de (ΔS) para estes complexos foram também negativos, indicando que os processos de complexação resultaram em sistemas ordenados e estáveis devido a redução da possibilidade de movimentos translacionais e rotacionais do AMH quando comparado com o fármaco livre (MARCELO et al., 2008; NGUYEN et al., 2013).

Após o desenvolvimento de formulações que tenham por finalidade melhorar a propriedade de solubilidade de moléculas pouco solúveis, há a necessidade de se realizar a caracterização de forma quali e quantitativa para verificação do grau de alteração das propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes.

Com a finalidade de verificar uma possível interação molecular entre o AMH nas dispersões contendo PEG 6000 assim como no complexo de inclusão utilizando a Metil- β -ciclodextrina por spray-drying, espectros no infravermelho foram realizados com as diferentes amostras. A partir das análises realizadas verificou-se uma redução significativa, assim como o desaparecimento de sinais referentes aos principais grupos químicos característicos da molécula do AMH.

A transição do estado cristalino da partícula para seu estado amorfo apresenta uma grande vantagem no que diz respeito ao processo de dissolução, uma vez que fármacos na forma cristalina apresentam uma estrutura rígida, definida e termodinamicamente estável,

enquanto que os sólidos amorfos as moléculas estão distribuídas ao acaso, não apresentando uma estrutura rígida e caracterizada (BANKAR; MAHATMA, 2012).

Para avaliar o grau de influência na amorfização do AMH promovida pela dispersão sólida contendo PEG 6000 e os complexos de inclusão, análises de difração de raios-X foram realizadas. A partir dos difratogramas obtidos verificou-se uma forte interação entre o fármaco e a dispersão sólida contendo o PEG 6000 na proporção 1:10, como também para os complexos de inclusão produzidos contendo as diferentes ciclodextrinas testadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Riekes e colaboradores (2010) onde complexos de inclusão contendo AMH e β -ciclodextrina foram desenvolvidos por mistura física, coevaporação, liofilização e secagem por aspersão. De acordo com os autores, os métodos mais eficientes para a amorfização do fármaco foram a liofilização e secagem por aspersão. Resultado similar foi encontrado por Sathigari e colaboradores (2009), após preparação de complexos por mistura física, amassamento e liofilização contendo efavirenz e β -cicloextrina, HP- β -cicloextrina e RM- β -cicloextrina, a amorfização completa do fármaco foi obtida a partir da liofilização da amostra.

Técnicas termo analíticas são frequentemente utilizadas para avaliar a relação entre uma propriedade da amostra e a sua temperatura. Entre as técnicas mais utilizadas destacam-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e a termomicroscopia (HST). Para moléculas que são possíveis de formar complexos com ciclodextrinas, a DSC é uma técnica rápida e simples para avaliar o grau de alteração do sinal endotérmico/exotérmico relativo ao ponto de fusão da molécula de interesse, podendo inferir se houve ou não a formação de um novo sistema sólido (SATHIGARI et al., 2009).

Com a finalidade de verificar possíveis alterações do sinal referente a temperatura de fusão do AMH, os complexos de inclusão assim como o AMH puro foram submetidos à análise por DSC. A partir da curva referente ao AMH puro se verificou um evento endotérmico em 163,47 °C, característico do ponto de fusão do fármaco, resultado este similar ao encontrado por Paduraru e colaboradores (2013) e Riekes e colaboradores (2010).

As curvas obtidas com os complexos produzidos pelos diferentes métodos mostraram uma redução e também ausência deste evento, característico do AMH no seu estado cristalino, caracterizando assim uma interação em diferentes níveis entre o fármaco e as ciclodextrinas.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) está presente em muitas áreas da pesquisa com a finalidade de aumentar o entendimento a respeito da superfície dos materiais, assim como das alterações morfológicas ocorridas após a realização de algum processo. Em estudos de complexação, esta técnica é utilizada frequentemente devido sua capacidade de

fornecer informações a respeito do estado de cristalização dos produtos obtidos por diferentes métodos de complexação e formação de dispersão sólida. Apesar da MEV não ser uma técnica que confirme a formação do complexo, grandes alterações podem ser visualizadas em relação a forma, aspecto e tamanho das partículas, indicando assim a formação de uma nova fase sólida (DUARTE et al., 2003; PRALHAD; RAJENDRAKUMA, 2004; RIBEIRO et al., 2003).

Com auxílio da MEV foi possível verificar partículas na forma de cristais irregulares característicos do AMH, assim como da β -ciclodextrina, por outro lado foram observadas partículas de formas esféricas e homogêneas para Metil- β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina. Com os produtos obtidos por mistura física e coevaporação foi possível verificar o AMH adsorvido em suas superfícies, resultado este confirmado através da análise de difração de raios-X, onde picos característicos dos cristais do fármaco foram observados e através da DSC, onde o evento endotérmico do fármaco foi detectado.

Uma amorfização dos cristais do AMH foi observada após a formação dos complexos de inclusão com as ciclodextrinas pelo método de spray-drying. As formulações apresentaram partículas esféricas e de tamanho homogêneo, levando à formação de uma nova forma sólida. Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas e colaboradores (2012) e Lopodota e colaboradores (2016), onde após formação de complexos contendo olanzapina e β -ciclodextrina e celecoxibe e metil- β -ciclodextrina respectivamente, os materiais sólidos obtidos apresentaram superfícies bem delimitadas e morfologia esférica.

De acordo com Bouquet e colaboradores (2007) e Veiga e colaboradores (2006) a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta muito útil e indispensável para a determinação da porção da molécula hospede que se encontra no interior da cavidade da ciclodextrinas após a produção dos complexos de inclusão.

Neste estudo foram realizados RMN utilizando o AMH puro, Metil- β -ciclodextrina e complexo de inclusão obtido por spray-drying. Após as análises, se verificou que os deslocamentos dos prótons do AMH foram similares aos deslocamentos encontrados por Jendrasiak e colaboradores (1990). A partir da análise do complexo de inclusão contendo o AMH, foram verificados a ausência dos sinais referentes aos H-1 e H-6 da estrutura química do AMH, podendo assim inferir que a porção da molécula do AMH que penetrou no interior da cavidade da ciclodextrina foi a porção lipofílica dietilamina.

Com a finalidade de complementar a caracterização realizada por RMN, estudos de modelagem molecular foram realizados. O uso desta abordagem como forma de avaliação tem sido cada vez mais importante, uma vez que a partir de imagens tridimensionais é possível

obter informações a respeito da estrutura mais provável do complexo de inclusão, mínima distância entre os principais átomos complexados, suas energias de ligação, assim como a quantidade de elétrons transferidos da molécula hóspede para a molécula hospedeira (ANGUIANO-IGEA et al., 1997; WEN; LIU; ZHU, 2005).

Em estudo realizado por Tang e colaboradores (2015) os resultados demonstraram que a formação dos complexos de inclusão, na proporção de 1:1, entre clorzoxazona e as ciclodextrinas metil- β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina ocorreram a partir da porção do anel benzeno do fármaco, o qual penetrou totalmente nos interiores das cavidades. Estudos de modelagem também foram realizados por Yuan e colaboradores (2012), onde a partir da formação de complexos entre astaxantina e HP- β -ciclodextrina, pode-se verificar que a configuração 1:2 (astaxantina:HP- β -ciclodextrina) foi a mais estável devido as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

Neste trabalho, diferentes configurações foram propostas a partir das aproximações entre as moléculas do AMH e da metil- β -ciclodextrina. Ao final do estudo, se verificou que as configurações AM-methyl- β -CD-I, a qual se deu a partir da entrada da porção dietilamina do AMH na cavidade da ciclodextrina e a AM-methyl- β -CD-II, formada pela interação do grupamento butil do fármaco com a cavidade, apresentaram maior estabilidade frente às outras configurações.

Para estas configurações não foram observadas ligações covalentes entre os átomos, indicando assim interações por adsorção física entre o AMH e a ciclodextrina. A partir da análise de transferência de cargas do sistema, a metil- β -ciclodextrina se comportou como receptora de elétrons, estando de acordo com os estudos realizados por Figueiredo e colaboradores (2016).

A configuração AM-methyl- β -CD-I apresentou energia de ligação entre os átomos de 0,76 eV, enquanto que a configuração AM-methyl- β -CD-II apresentou 0,71 eV, ou seja, a configuração I demonstrou ser mais estável quando comparada com a II, sendo a configuração que melhor representou a formação do complexo de inclusão neste estudo.

Formas de dosagem sólidas como comprimidos, cápsulas e grânulos são uma das formas farmacêuticas mais convenientes e seguras para terapia de diversas patologias. No entanto, o processo de fabricação destas inclui diferentes fatores como seleção adequada dos equipamentos, processos, assim como o uso de diferentes excipientes que podem afetar a biodisponibilidade dos ingredientes ativos (LENNERNAS; ABRAHAMSSON, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; TAO; DESAI, 2005). Para avaliar o comportamento de liberação do ingrediente ativo a partir das formas farmacêuticas sólidas,

ensaios de dissolução são realizados lote a lote durante o desenvolvimento e produção de um novo medicamento (PRYIA; MURTHY, 2012).

Com a finalidade de avaliar o grau de influência que as misturas físicas, dispersões sólidas e os complexos de inclusão promoveram na solubilidade e, conseqüentemente, na taxa de dissolução do AMH, perfis de dissolução *in vitro* foram realizados utilizando AMH puro, dispersões sólidas e complexos de inclusão na forma de pós e comprimidos de liberação imediata contendo 10 mg de AMH complexado com metil- β -CD por spray-drying.

Para os pós contendo as dispersões sólidas utilizando PEG 4000 e 6000 e complexos de inclusão contendo β -ciclodextrina, Metil- β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina, a solubilidade do AMH foi dependente do pH nos meios avaliados (tampão ácido pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água) estando de acordo com os resultados anteriormente obtidos nos ensaios de solubilidade (PADURARU et al., 2013).

A partir dos perfis de dissolução do AMH puro, foi possível observar este comportamento, uma vez que ao final do tempo máximo avaliado, 60 minutos, em torno de apenas 22,2% do AMH foi dissolvido em água, 7,83%, 18,31% e 4,82% foram dissolvidos em tampão ácido pH 1,2, tampão acetato 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente.

A dispersão sólida utilizando PEG 4000 e produzida pelo método de fusão, apresentou uma dissolução do fármaco muito semelhante ao AMH puro, podendo ser explicado devido a uma pequena interação entre o AMH e o carreador, ocasionando assim um baixo grau de amorfização, por outro lado, o método de amassamento na proporção 1:1 mostrou ser mais eficiente para o aumento da taxa de dissolução do AMH, apresentando uma dissolução em torno de 0,038 mg/mL e 0,034 mg/mL do AMH nos meios água e tampão acetato pH 4,5, respectivamente.

As dispersões sólidas preparadas com PEG 6000 (1:10) pelo método de fusão, apresentaram taxas de dissolução maiores e mais rápidas para os dois meios testados. Em meio de dissolução tampão acetato pH 4,5 a taxa de dissolução foi em torno de 4,4 vezes maior quando comparado com o fármaco puro, demonstrando a importante função do PEG 6000 no aumento da solubilidade de moléculas pouco solúveis em meios fisiológicos.

Com a finalidade de avaliar a capacidade que as ciclodextrinas e os diferentes métodos de preparo dos complexos poderiam influenciar na solubilidade do AMH, perfis de dissolução foram realizados utilizando os meios água, tampão ácido pH 1,2, tampão acetato 4,5 e tampão fosfato pH 6,8.

As misturas físicas apresentaram ao final do tempo de 60 minutos em torno de 30% de dissolução do AMH nos meios avaliados. Os complexos de inclusão formados por

coevaporação, freeze-drying e spray-drying para todas ciclodextrinas testadas apresentaram um aumento significativo na taxa de dissolução do AMH quando comparados aos resultados obtidos pelo método de mistura física. Os complexos obtidos por *spray-drying* apresentaram em torno de 55%, 56%, 65% e 38% de dissolução do fármaco em água, tampão ácido 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente. A grande influência da metil- β -ciclodextrina na dissolução do AMH pode ser explicada devido a sua boa solubilidade em água, alta capacidade para amorfizar e aumentar a capacidade de molhabilidade das partículas cristalinas (FERNANDES et al. 2002).

Também foram determinados os perfis de dissolução dos comprimidos de liberação imediata contendo o AMH complexado com metil- β -ciclodextrina pelo método de *spray-drying*. Para a produção dos comprimidos foi utilizado o método de compressão direta, método este mais simples de reduzir tempo e custos durante o processo, uma vez que ocorre uma redução das operações envolvidas na mistura dos excipientes antes da compressão (AULTON, 2005).

Foram desenvolvidas três formulações, cada formulação contendo quantidade teórica de excipientes para produção de lotes contendo 100 comprimidos cada, denominadas F1, F2 e F3. Ao final de cada processo de compressão os mesmos foram submetidos aos ensaios de variação de peso, dureza, espessura, diâmetro, friabilidade, tempo de desintegração, perfil de dissolução e doseamento do AMH (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

Após a realização dos ensaios de controle de qualidade citados, todas as formulações apresentaram resultado satisfatórios, porém a F1 apresentou perda de pó maior que 1,5%, estando reprovada no teste de friabilidade, o que acabou inviabilizando a continuidade dos ensaios de perfil de dissolução para esta formulação.

As formulações F2 e F3 apresentaram perfis de dissolução semelhantes em ambos os meios avaliados (água e tampão acetato pH 4,5). As maiores taxas de dissolução do AMH ocorreram utilizando tampão acetato pH 4,5, ao final de 60 minutos de ensaio as formulações F1 e F2 liberaram em média 93,31% e 87,14% do AMH respectivamente.

Uma liberação do tipo imediata, foi conseguida apenas ao utilizar tampão acetato pH 4,5 como meio de dissolução. Para as formulações F2 e F3, após 45 minutos de ensaio, em média 90,87% e 80,23% do AMH foram liberados respectivamente, cumprindo com os requisitos da resolução vigente para comprimidos de liberação imediata, o qual menciona que para uma forma farmacêutica sólida oral possuir este tipo de liberação, deve-se ter uma liberação média do fármaco de não menos que 75% dentro de 45 minutos (ANVISA, 2010).

A partir dos resultados obtidos ficou clara a influência no parâmetro de solubilidade causada pela metil- β -ciclodextrina, sendo este um promissor excipiente que poderá ser utilizado no desenvolvimento farmacotécnico de novos produtos sólidos orais contendo, principalmente, fármacos classe II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutico.

Conclusões

- ✓ A matéria-prima cloridrato de amiodarona foi caracterizada e identificada junto a sua Substância Química de Referência através das técnicas de espectrofotometria na região do ultravioleta/visível e infravermelho e por Ressonância Magnética Nuclear do Próton (H^+);
- ✓ O método desenvolvido por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para análise quantitativa do fármaco nas diferentes formulações foi linear, específico, preciso, exato e robusto para finalidade pretendida;
- ✓ As dispersões sólidas contendo os diferentes polímeros hidrofílicos e os complexos de inclusão foram capazes de melhorar a propriedade de solubilidade do cloridrato de amiodarona em água e nos diferentes fluidos fisiológicos avaliados;
- ✓ As técnicas utilizadas para caracterização do estado sólido das dispersões sólidas e complexos de inclusão foram capazes de demonstrar a interação entre o fármaco e os carreadores, assim como demonstrar a amorfização do fármaco a partir das diferentes formulações produzidas;
- ✓ Foram desenvolvidos comprimidos de liberação imediata contendo 10 mg de Cloridrato de Amiodarona complexado com metil- β -ciclodextrina por *spray-drying*;
- ✓ Os polímeros hidrofílicos e as ciclodextrinas utilizadas no trabalho demonstraram suas importantes funções para finalidade pretendida, podendo ser utilizados como adjuvantes no incremento da solubilidade de fármacos pouco solúveis;
- ✓ As técnicas de preparo das formulações utilizadas neste trabalho demonstraram que podem ser ferramentas importantes para o desenvolvimento de dispersões sólidas e complexos de inclusão.

ADELI, E. A.; Comparative evaluation between utilizing SAS supercritical fluid technique and solvent evaporation method in preparation of Azithromycin solid dispersions for dissolution rate enhancement. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.87, p.9-21, 2014.

ALVES, L. D. S. et al. Solid dispersion of efavirens in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. **Carbohydrate Polymers**. v.104, p.166-174, 2014

AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th. ed. London: Pharmaceutical Press, 918p.

AMICO, J. et al. Clinical and chemical assessment of thyroid function during therapy with amiodarone. **Archives of Internal Medicine**. v.144, n.3, p.487-490, 1984.

AMIDON, 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.

ANDREASEN, F. et al. Pharmacokinetics of Amiodarone after Intravenous and Oral Administration. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v.19, n.4, p.293-299, 1981.

ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F. J.; VILA-JATO, J. L.; BLANCO-MENDEZ, J. Interaction of clofibrate with cyclodextrin in solution: Phase solubility, ¹H NMR and molecular modelling studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.5, p.215–221, 1997.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Medicamentos**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73282480495e08868778dfb32cf0f1c1/Lista+A+09-09-2015.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 set. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 31 de 11 de agosto de 2010. Dispõe Sobre a Realização de Estudos e Equivalência Farmacêutica e de perfil de Dissolução Comparativo.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 677p.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Thermal Analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v.260, n.2, p.303-314, 2003.

ASKER, A. F.; WHITWORTH, C. W. Dissolution of acetylsalicylic acid from acetylsalicylic acid-polyethylene glycol 6000 coprecipitates. **Pharmazie**. v.30, p.530-531, 1975.

ASO Y. et al. Molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions as determined by ¹⁹F-NMR relaxation time. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.11, p.S2, 2009.

BABATIN, M.; LEE, S. S.; POLLAK, P. T. Amiodarone hepatotoxicity. **Current Vascular Pharmacology**. n.6, p.228-236, 2008.

BABU, R.; PANDIT, J. K. Effect of aging on the dissolution stability of glibenclamide/beta-cyclodextrin complex. **Drug Development Industrial Pharmacy**. v.25, n.1, p.1215-1219, 1999.

BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, n.5, p.396-421, 2012.

BANKAR, P. V.; MAHATMA, O. P. Improved dissolution rate of leflunomide using hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexation by Freeze-Drying Method. **International Journal of Drug Delivery**. v.4, n.4, p.498-506, 2012.

BASARIA, S.; COOPER, S. D. Amiodarone and the thyroid. **The American Journal of Medicine**. v.118, p.706-714, 2005.

BEKERS, O. et al. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.17, n.11, p.1503-1549, 1991.

BOBE, K. R. Formulation and evaluation of solid dispersion of atorvastatin with various carriers. **International Journal of Comprehensive Pharmacy**. v.2, n.1, p.1-6, 2011.

BONATI, M. et al. Physicochemical and analytical characteristics of amiodarone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.73, n.6, p.829-831, 1984.

BOUQUET, W. I.; CEELLEN, W.; FRITZINGER, B.; PATTYN, P.; PEETERS, M.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation and stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 66, 391-7, 2007

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”; Publicada no D.O.U. de 02 de junho de 2003b

BREWSTER, M. E. et al. Effects of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicin hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**. v.79, n.1-3, p.289-299, 1992.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationary Office, 2012. v.1, p.137-138.

BROWN, C. et al. Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**. v.2, p.56-65, 2004.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrin in Drug Delivery: An Updated Review. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.6, n.2, p. 329-357, 2005.

CHIOU, W.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical application of solid dispersion system. **Journal Pharmaceutical Sciences**. v.60, n.9, p.1281-1302, 1971.

CHOI, H. G. et al. Terfenadine-beta-cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.27, p.857-862, 2001.

CHOWDARY, K. P. R.; PRASAD, T. R. S. Physical stability and dissolution rate of paracetamol suspensions formulated employing its solid dispersions. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.62, p.19-22, 2003.

CHOW, A. et al. Assessment of wettability and its relationship to the intrinsic dissolution rate of doped phenytoin crystals. **International Journal of Pharmaceutics**. v.126, n.1-2, p.21-28, 1995.

CWIERTNIA, B.; HLADON, T.; STOBIECKI, M. Stability of Diclofenac sodium in the inclusion complex in the beta cyclodextrin in the solid state. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.51, n.11, p.1213-1218, 1999.

DAMIAN, F. et al. Physical stability of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with PEG 6000, Gelucire 44/14 and PVP K30. **International Journal of Pharmaceutics**. v.244, n.1-2, p.87-98, 2002.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins based pharmaceutics: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.3, p.1023-1035, 2004.

DRESSMAN, J. B. et al. Gastrointestinal parameters that influence oral medications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.82, p.857-872, 1993.

DUARTE, L. C. et al. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisa em Geociências**. v.30, n.2, p.3-15, 2003.

EGHRARY, S.H.; et al. Solubility of 2-butyl-3-benzofuranyl 4-(2-(diethylamino)ethoxy-3,5-diiodophenyl ketone hydrochloride (Amiodarone HCl) in ethanol + water and *N*-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures at various temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v.57, p.1544-1550, 2012.

ELHASI, S.; ASTANEH, R.; LAVASANIFAR, A. Solubilization of an amphiphilic drug by poly(ethylene oxide)-block-poly(ester) micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.65, p.406-413, 2007

Farmacopeia Brasileira. 2010, 5 ed. Fiocruz, Brasília.

FATHY, M.; SHEHA, M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of amylobarbitone/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex prepared by freeze-drying method. **Pharmazie**. v.202, p.165-171, 2000.

FASINU, P. et al. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**. v.32, p.185-209, 2011.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: analytical procedures and methods validation. Chemistry, manufacturing and controls documentation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center Biological Evaluation and Research (CBER), 2000b.

FERNANDES, C. M.; VIEIRA, M. T.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical characterization and *in vitro* dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.15, p.79-88, 2002.

FERRAZ, H. G. Novas Ferramentas Farmacotécnicas para Modular a Biodisponibilidade de Medicamentos. In: _____ . **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011. p. 66-67.

FIGUEIREDO, J.; SILVA, L. B.; PONTES, R. B.; ZANELLA, I.; FAGAN, S. B. Interaction of α -Tocopherol with α - and β -Cyclodextrins: A First-Principles Investigation. **Journal Nanopharmaceutics Drug Delivery**. v.3, p.70-77, 2016.

FLEGO, C.; LOVRECICH, M.; RUBESSA, F. Dissolution rate of griseofulvin from solid dispersion with poly(vinylmethylether: maleic anhydride). **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.14, n.9, p.1185-1202, 1998.

FLÓREZ, J.; ARMIJO, J. A.; MEDIAVILLA, A. **Farmacología Humana**. 5ª ed. Buenos Aires: M.ass.on, 2008, 1481p.

FREITAS, M.R. et al. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**. v.89, p.1095-1100, 2012.

FRIESEN, D. T. et al. Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-based spray-dried dispersions: an overview. **Molecular Pharmaceutics**. v.5, p.1003–1019, 2008.

GILL, J.; HEEL, R.; FITTON, A. Amiodarone: an overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias. **Drugs**. v.43, n.1, p.69-110, 1992.

GOLAN, D. E. et al. **Princípio de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 952p.

GOLLI-BENNOUR, E. E. et al. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v.64, p.425-430, 2012.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005, 1647p.

GREENHALGH, D. J. et al. Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.88, n.11, p.1182-1190, 1999.

GUEDES, F. L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.89, n.3, p.220-225, 2008.

HABIB, F. S.; ATTIA, M. A. Effect of particle size on the dissolution rate of monophenylbutazone solid dispersion in presence of certain additives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.11, n.11, p.2009-2019, 1985.

HANCOCK, B. C. Disordered drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.54, n.6, p.737-746, 2002.

HEISE, H. M. et al. Infrared spectroscopy and Raman spectroscopy of cyclodextrin derivatives and their ferrocene inclusion complexes. **Vibrational Spectroscopy**. v.53, n.1, p.19-23, 2010.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.36, n.1, p.125-141, 1999.

HORTER, D., DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.25, p.3-14, 1997.

HOSTETLER, K. Y.; GIORDANO, R.; JELLISON, E. J. In vitro inhibition of lysosomal phospholipase A1 of rat lung by amiodarone and desethylamiodarone. **Biochimica et biophysica Acta**. v.959, n.3, p.316-321, 1988.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedures-Methodology, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

JABLAN, J.; SZALONTAI, G.; JUG, M. Comparative analysis of zaleplon complexation with cyclodextrins and hydrophilic polymers in solution and in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomed Analysis**. v.71, p.35-44, 2012.

JAGDALE, S. F. et al. Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of nifedipine-beta-cyclodextrin complexes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.48, n.1, p.131-145, 2012.

JENDRASIAK, G. L. et al. Amiodarone-liposome interaction a multinuclear NMR and X-ray diffraction study. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1024, p.19-31, 1990.

KHAN, M. A. et al. Validation of a Stability Indicative LC Method for Amiodarone HCl and Related Substances. **Chromatographia**. v.61, p.599-607, 2005.

KONNO, H.; TAYLOR, L. S. Influence of different polymers on the crystallization tendency of molecularly dispersed amorphous felodipine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.95, n.12, p.2692-2705, 2006.

KURUMA, T. et al. Relationship between amiodarone-induced subclinical lung toxicity and Th1/Th2 balance. **International Journal of Cardiology**. v.134, n.2, p. 224–230, 2009.

LAPINSKY, S. E.; MULLEN, J. B.; BALTER, M. S. Rapid pulmonary phospholipid accumulation induced by intravenous amiodarone, **The Canadian Journal of Cardiology**. v.9, n.4, p.322-324, 1993.

LACY, C. F. et al. Drug Information Handbook with International Trade Names Index. 20th ed. Lexicomp, 2011, 2263p.

LAFUENTE-LAFUENTE, C. Amiodarone concentrations in plasma and fat tissue during chronic treatment and related toxicity. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v.67, n.5, p.511-519, 2009.

LENNERNAS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v.57, p.273-285, 2005.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical**. v.50, n.3, p.47-60, 2000.

LIMA et al. Solid dispersion system for increase solubility: cases with hydrophobic polymers in poorly water soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmacy**. v.92, n.4, p.269-278, 2011.
LIPKA, E.; AMIDON, G. L. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. **Journal of Control Release**. v.62, p.41-49, 1999.

LIPINSKI, C. Poor aqueous solubility – an industry wide problem in drug discovery. **American Pharmaceutical Review**. v.5, p.82-85, 2002.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. v.329, p.1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J. F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. **S.T.P. Pharma Sciences**. v.9, n.3, p.237-242, 1999.

LOFTSSON, T.; PETERSON, D. S. Cyclodextrin solubilization of ETH-615, a zwitterionic drug. **Drug development Industrial Pharmacy**. v.24, n.4, p.365-370, 1998.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**. v.225, n.1-2, p.15-30, 2001.

LOPEDOTA, A. et al. Spray dried chitosan microparticles for intravesical delivery of celecoxibe: preparation and characterization. **Pharmaceutical Research**. v.33, n.9, p.2195-2208, 2016.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.31, n.2, p.117-124, 2010.

MAJERIK, V. et al. Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.40, n.1 p.101–110, 2007.

MASSEY, T. E. et al. Mechanisms in the pathogenesis of amiodarone-induced pulmonary toxicity. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.73, n.12, p.1675–85, 1995.

MARCELO, G. et al. Fluorescence properties of (R)-and (S)-[1,1 -binaphthalene]-2,2 -diols solutions and their complexes with cyclodextrins in aqueous medium. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.200, p.114-125, 2008.

MODI, A.; TAYADE, P. Enhancement of dissolution profile by solid dispersion (kneading) technique. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.7, n.3, p.1-6, 2006.

MUHAMMAD, T. et al. Monitoring Dissolution Rate of Amiodarone Tablets by a Multiple Fiber-Optic Sensor System. **Dissolution Technologies**. v.15, n.1, p.22-27, 2008.

NERNST, W. Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen System. **Zeit. Physikal Chemistry**. v.47, p.52-55, 1904.

NEWMAN, A. et al. Characterization of amorphous API: Polymer mixtures using X-ray powder diffraction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.97, n.11, p.4840-4856, 2008.

Nguyen, T.; Liu, B.; Zhao, J.; Thomas, D.; Hook, J. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food Chemistry**. v.136, p.186-192.

NICOLAZZI, C. et al. In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with beta-cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. **Antiviral Research**. v.54, n.2, p.121-127, 2002.

PADURARU, O. M. et al. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility of an antiarrhythmic agent. **Industrial & Engineering Chemical Research**. v.52, n.5, p.2174-2181, 2013.

PAPIRIS, S. A. et al. Amiodarone: review of pulmonary effects and toxicity. **Drug Safety**. v.33, n.7, p.539-558, 2010.

PATEL, B. P. et al. A review on techniques which are useful for solubility enhancement of poorly water soluble drugs. **International Journal for Research in Management and Pharmacy**. v.1, n.1 p.56-70, 2012.

PATEL, R. P. et al. Physicochemical Characterization and Dissolution Study of Solid Dispersions of Furosemide with Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone K30. **Dissolution Technologies**. v.15, n.3, p.17-25, 2008.

POUTON, C. W. et al. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: a mechanistic basis for utility. **Journal of Drug Targeting**. v.18, n.10, p.704-731, 2010.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMA, K. Study of freeze-dried quercetin-cycloextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffractions and SEM analysis. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.34, n.2, p.333-339, 2004.

PRIYA, M. B. V.; MURTHY, T. E. G. K. Development of Discriminative Dissolution Media for Marketed Gliclazide Modified-Release Tablets. **Dissolution Technologies**. v.19, n.2, p.38-42, 2012.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.85, n.11, p.1142-1169, 1996.

RAMA, A. C. R. et al. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.4, n.1, p.59-68, 2006.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 804p.

RAO, R. C. et al. Conformation of amiodarone HCl: A solution and Solid State ^{13}C -NMR Study. **Pharmaceutical Research**. v.11, n.8, p.1088-1092, 1994.

REASOR, M. J.; KACEW, S. An evaluation of possible mechanisms underlying amiodarone-induced pulmonary toxicity. **Experimental Biology and Medicine**. v.212, n.4, p.297-304, 1996.

RIBEIRO, L. et al. Investigation and physicochemical characterization of vincocetine-sulfobutyl ether β -cyclodextrin binary and ternary complexes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.51, n.8, p.914-922, 2003.

RIEKES, M. K. et al. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. **Materials Science and Engineering**. v.30, p.1008-1013, 2010.

RODEN, D. M. Mechanisms underlying variability in response to drug therapy: implications for amiodarone use. **American Journal of Cardiology**. v.84, n.9, p.29-36, 1999.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6^a ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 855 p.

ROTH, F. C. et al. Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.204, p.135-139, 2013.

SAMMOUR, A. O. et al. Formulation and optimization of mouth dissolve tablets containing rofecoxib solid dispersion. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.7, n.2, p.167-175, 2006.

SANGWAI, M.; VAVIA, P. Amorphous ternary cyclodextrin nanocomposites of telmisartan for oral drug delivery: Improved solubility and reduced pharmacokinetic variability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.453, n.2, p. 423-432, 2013.

SATHIGARI, S. et al. Physicochemical Characterization of Efavirenz–Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.10, n.1, p.81-87, 2009.

SANTOS, A. S. **Avaliação das propriedades de estado sólido de dispersões de hidroclorotiazida em polivinilpirrolidona**. 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SEKIGUCHI, S.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that ordinary sulfathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.9, p.866-872, 1961.

SERAJUDDIN, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs, **Journal Pharmaceutical Sciences**. v.10, p.1058–1066, 1999.

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

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. v.20, n.2-3, p.215-247, 2003.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. New York: McGraw-Hill, p.267-269, 2005.

SHAH, J. C.; CHEN, J. R.; CHOW, D. Preformulation study of etoposide, increased solubility and dissolution rate by solid-solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.113, n.1-2, 1995.

SHARMA, A.; JAIN, C. P. Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. **International Journal of Drug Delivery**. v.3, n.2, p.149-170, 2011.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIELME, D. J. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editora S.A, 2007, 490p.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**. v.20, p.341-359, 2002.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, p.515–527, 2007.

STELLA, V. J.; RAJEWSKI, R. A. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. **Pharmaceutical Research**. v.14, n.5, p.556-567, 1997.

STELLA, V. et al. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V.36, n.1, p.3-16, 1999.

STREUBEL, A. et al. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. **Current Opinion in Pharmacology**. v.6, n.5, p.501–508, 2006.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**. v.98, n.5, p. 1743-1753, 1998.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**. v.98, p.1743-1753, 1998.

TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**. v.131, n.20, p.297-305, 2015.

TAUPITZ, T. et al. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behavior of poorly soluble drugs. Case example: itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.83, n.3, p.378-387, 2013.

TAO, S. L.; DESAI, T. A. Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery. **Drug discovery today**. V.3, p. 909 – 915, 2005.

The United States Pharmacopeia, 35^o ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville: 2012.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins-Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. v.14, n.1, p.1-104, 1997.

TRUMBORE, M. et al. Structure and location of amiodarone in a membrane bilayer as determined by molecular mechanics and quantitative x-ray diffraction. **Biophysical Journal**. v.54, n.3, p.535-543, 1988.

UEKAMA, K. et al. Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.72, p.1338-1341, 1983.

UEKAMA, K.; IRIE, T. New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical applications cyclodextrins derivatives as new drugs carriers. **International Journal of Pharmaceutics**. v.271, p.155-165, 2004.

VASCONCELOS, T.; COSTA, P. Development of a rapid dissolving ibuprofen solid dispersion. In: **Pharmaceutical Sciences World Conference**. 103, 2007.

VAN DEN MOOTER, G. et al. Physical stabilization of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone k25. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.12, n.3, p.261–269, 2001.

VASSALLO, P.; TROHMAN, R. G. Prescribing amiodarone: an evidence based review of clinical indications. **The Journal of the American Medical Association**. v.298, n. 11, p.1312-1322, 2007.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. p.9-33.

VEMULA, V.; LAGISHETTY, V.; LINGALA, S. Solubility Enhancer Techniques. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v.5, p.41-51, 2010.

VERHEYEN, S. et al. Mechanism of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.249, n.1-2, p.45–58, 2002.

VIPPAGUNTA, S. R. et al. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.96, n.2, p.294-304, 2006.

WEN, X.; LIU, Z.; ZHU, T. Mass spectrometry and molecular modeling studies on the inclusion complexes between α,β -cyclodextrins and simvastatin. **Chemical Physics Letters**. v.405, p.114–117, 2005.

WILLIAMS, V. The experimental basis for the choice of an anti-arrhythmic drug. **Advance Cardiology**. v.4, p.275-289, 1970.

WON, D. H. et al. Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process. **International Journal of Pharmaceutics**. v.301, n.1, p.199-208, 2005.

YUAN, C.; JIN, Z.; XU, Z. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ^1H NMR and molecular modeling studies. **Carbohydrate Polymers**. v.89, p.492-496, 2012.

ZHANG, J. et al. The stability of solid dispersions of felodipine in polyvinylpyrrolidone characterized by nanothermal analysis, **International Journal of Pharmaceutics**. v.414, n.1-2, p.210–217, 2011.

ZUO, Z. et al. Flutamide-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: formulation, physical characterization, and absorption studies using the Caco-2 in vitro model. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v.3, n.2, p.220-227, 2000.