

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Análise da estrutura de dispersões sólidas amorfas de
fármacos pelo método Pair Distribution Function**

Rodrigo Nori Zuntini

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador:
Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo

São Paulo

2024

	Sumário	Pág.
Lista de abreviaturas.....		1
Resumo.....		2
Abstract		
INTRODUÇÃO.....		3
OBJETIVOS.....		4
MATERIAL E MÉTODOS.....		5
RESULTADOS.....		6
DISCUSSÃO.....		7
CONCLUSÃO.....		8
REFERÊNCIAS.....		9
ANEXOS.....		10

LISTA DE ABREVIATURAS

- PDF - Pair Distribution Function
PCA - Principal Component Analysis
PC1 - Componente Principal 1
DSA - Dispersão Sólida Amorfa
LMF - Lumefantrina

RESUMO

ZUNTINI, R. N. **Análise da estrutura de dispersões sólidas amorfas de fármacos pelo método Pair Distribution Function.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2024

Palavras-chave: Dispersão Amorfa; Cristalinidade; Pair Distribution Function;

INTRODUÇÃO: A análise da cristalinidade em dispersões amorfas é essencial para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos. Embora a difração de raios X seja amplamente usada, suas limitações em distinguir estados amorfos exigem novas abordagens. Este projeto propõe combinar métodos experimentais e teóricos para uma caracterização mais precisa da cristalinidade em sistemas farmacêuticos. **OBJETIVO:** Este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade de integrar métodos laboratoriais, como a difração de raios X, com abordagens teóricas, como a Função de Distribuição de Pares (Pair Distribution Function), e ferramentas estatísticas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), para quantificar o grau de cristalinidade e a similaridade entre amostras, considerando as interações entre polímero e fármaco. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para criar diferentes grupos de teste de forma controlada, as amostras foram preparadas com a lumefantrina pura (sem polímeros), tanto no estado amorfo quanto cristalino, sendo utilizada como referências. Para comparação entre o composto puro e as diferentes formulações, o LMF foi combinado com HPMC E-3 e HPMC E-15 para preparar dispersões amorfas sólidas em dois lotes diferentes de amostras, com o mesmo processo sendo repetido para a mistura de LMF e HPMCP-50, 55 e 55S. Na sequência, as amostras foram analisadas por difração de raios X de alta energia (luz síncrotron). Os arquivos foram então tratados através do software DawnScience, transformando as informações obtidas em dados de espalhamento total, posteriormente, os dados foram tratados com o software PDFgetX2, criando os arquivos S(Q) e G(r), que por sua vez foram carregados em OriginLab,

transformados em gráficos e os arquivos de texto dos referidos gráficos foram inseridos no Minitab, utilizando-os como base para a análise do PCA. RESULTADOS: Foi possível constatar a completa amorfização das dispersões sólidas e identificar diferenças nas regiões intermoleculares em função da interação com os polímeros ácidos derivados de hidroxipropilmetilcelulose. Em uma abordagem inovadora, utilizou-se a PCA com a construção de gráficos de dispersão PC1x PC2xPC3 para avaliação dos padrões de PDF. CONCLUSÃO: Concluiu-se que tal abordagem é muito promissora para solucionar o problema de tratamento da grande quantidade de dados gerados nesses ensaios e para diferenciar dispersões sólidas muito semelhantes em relação à cristalinidade e tipo polímero utilizado.

1. INTRODUÇÃO

A solubilidade de muitos fármacos é um obstáculo frequente enfrentado pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos orais. Em especial, os fármacos classe II, de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, são fármacos problemáticos, que apesar de serem bem absorvidos no trato gastrointestinal (TGI) possuem biodisponibilidade limitada em função da sua baixa solubilidade. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi criado em 1995 como uma maneira de minimizar a necessidade de testes de bioequivalência durante o processo de desenvolvimento de fármacos, com o racional de que se as características principais que regem a concentração de um fármaco forem iguais entre dois produtos distintos, então a sua bioequivalência também será muito similar. Tais características analisadas são a Solubilidade, e Permeabilidade do fármaco pela membrana intestinal, com a dissolução do fármaco também sendo avaliada porém sendo considerada menos crítica(YASIR et al., 2010).

A caracterização da permeabilidade do fármaco é baseada na quantidade do composto que é capaz de atravessar a membrana plasmática intestinal, ou seja, capaz de ser realmente absorvida pelo corpo do paciente, com um composto sendo considerado muito permeável quando 90% ou mais do mesmo é capaz de atravessar a membrana, caso não atingir este valor o mesmo é considerado pouco permeável. A solubilidade, por outro lado, é caracterizada ao se tentar dissolver a maior dosagem planejada do medicamento em questão em 250ml de água em um intervalo de pH de 1 a 7. Caso o produto se solubilize em tais condições ele será considerado altamente solúvel, caso contrário será considerado pouco solúvel. A última determinação é baseada na capacidade do produto de liberação imediata se dissolver em 30 minutos quando colocado em parâmetros especificados pelo

FDA, com uma dissolução de 85% ou mais sendo considerado de rápida dissolução e caso contrário sendo considerada de dissolução lenta(BONAMICI, 2009).

Tais determinações são utilizadas para definir a classe à qual o produto pertence através de um Quadro (Quadro 1). Por causa de suas propriedades físico-químicas em comum, os fármacos em cada classe compartilham um Fator Limitante de Absorção, ou seja, em qual ponto do trato gastrointestinal haverá o maior obstáculo para a efetividade do consumo do produto. Fármacos de Classe I, por sua alta solubilidade e permeabilidade, possuem como fator limitante de sua absorção o esvaziamento gástrico, ou seja, a taxa com que o medicamente fisicamente percorre o trato gastrointestinal do paciente. Os de classe II possuem alta permeabilidade e baixa solubilidade, o que acarreta com que a dissolução seja o fator limitante, já que suas propriedades garantem que a quantidade liberada de fármaco será facilmente absorvida no intestino. O oposto será observado nos fármacos Classe III, demonstrando uma alta solubilidade, tais compostos serão facilmente “Liberados” para serem absorvidos no intestino, porém sua principal limitação para absorção será sua baixa capacidade de atravessar a membrana plasmática das células intestinais. Por sua vez, os fármacos de Classe IV demonstram tanto baixa permeabilidade quanto solubilidade, o que resulta em medicamentos problemáticos para administração oral, o que frequentemente gera a necessidade de se desenvolver maneiras alternativas de melhorar ou compensar as características físico-químicas dos mesmos(BONAMICI, 2009).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Quadro 1: Quadro de classificação Biofarmacêutica

Como mencionado anteriormente, fármacos classe II demonstram solubilidade indesejável para administração oral. Esta característica pode ser causada e potencializada, entre outros motivos, pela estrutura cristalina adotada pelo fármaco em questão. Inicialmente todo fármaco conhecido tem a capacidade de adotar múltiplas estruturas cristalinas diferentes, porém, por causa de barreiras energéticas e instabilidade, muitas vezes somente a sua forma mais estável é capaz de ser utilizada; por possuir menor energia livre, esta forma mais estável possui uma menor solubilidade e, por consequência, é

absorvida no TGI de maneira mais lenta quando administrados por via oral (DE ARAUJO et al., 2012).

Uma maneira de contornar tais problemas de solubilidade é a utilização do fármaco em sua forma amorfa, ou seja, uma forma não cristalizada. Isso se dá pelo fato que em sua forma amorfa os fármacos possuem maior energia livre, entalpia e entropia quando comparados com a forma cristalina, o que acarreta uma maior solubilidade em água e maior taxa de dissolução, o que leva a uma maior absorção oral (NAZARETH JÚNIOR et al., 2018). Porém, tal energia intrínseca ao estado amorfo confere uma grande instabilidade termodinâmica, ou seja a tendência de sofrer recristalização. Assim, o retorno do estado amorfo (mais energético e mais instável) para o estado cristalino (menos energético e mais estável), impactará negativamente na solubilidade do fármaco em questão (NAZARETH JÚNIOR et al., 2018).

Para impedir ou ao menos retardar a recristalização de um fármaco é possível adicionar certos excipientes em formulações, como por exemplo certos polímeros, que impedem a recristalização do composto ao evitar o processo de nucleação (RAGHAVAN et al., 2001). Tal sistema amorfo é denominado Dispersão Sólida Amorfa (DSA). Entretanto, vale mencionar a necessidade de uma boa interação entre o fármaco e o polímero escolhido para que se impeça a recristalização efetivamente. Esta especificidade aumenta a complexidade da utilização de dispersões sólidas no desenvolvimento de medicamentos, pois o fármaco e a matriz precisam interagir de maneira uniforme de forma a estabilizar o fármaco na forma amorfa. Um exemplo da aplicação das DSAs pode ser visto no desenvolvimento de uma nova formulação da lumefantrina (LMF, Figura 1).

A lumefantrina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da malária, particularmente em combinação com a artemeter em terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs). Essa combinação, conhecida como artemeter-lumefantrina, é recomendada como primeira ou segunda linha de tratamento para a malária não complicada em mais de 40 países, especialmente na África subsaariana, onde a malária é endêmica. A eficácia da lumefantrina é em grande parte atribuída à sua meia-vida longa, aproximadamente 4,5 dias, o que permite a eliminação dos parasitas remanescentes e reduz o risco de desenvolvimento de resistência(MAKANGA; KRUDSOOD, 2009).

Do ponto de vista farmacocinético, a lumefantrina exibe uma absorção dependente de gordura, sendo sua biodisponibilidade significativamente aumentada quando administrada com alimentos ricos em lipídios. A distribuição do fármaco é caracterizada por um modelo bicompartmental, com uma primeira fase de distribuição rápida, seguida de uma eliminação mais lenta(MAKANGA; KRUDSOOD, 2009). Estudos demonstram que a concentração plasmática de lumefantrina é um fator crítico para o sucesso terapêutico,

especialmente em crianças pequenas, onde a exposição ao fármaco tende a ser menor em comparação com adultos, o que pode aumentar o risco de recorrência da parasitemia.

No entanto, a variabilidade na resposta ao tratamento com lumefantrina pode ser influenciada por fatores como idade, peso e coadministração de outros medicamentos, como a trimetoprima-sulfametoxazol. Crianças com menos de três anos, particularmente as que apresentam baixo peso, estão entre as mais vulneráveis à subdosagem, o que pode comprometer a eficácia do tratamento e contribuir para o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos (TCHAPARIAN et al., 2016)

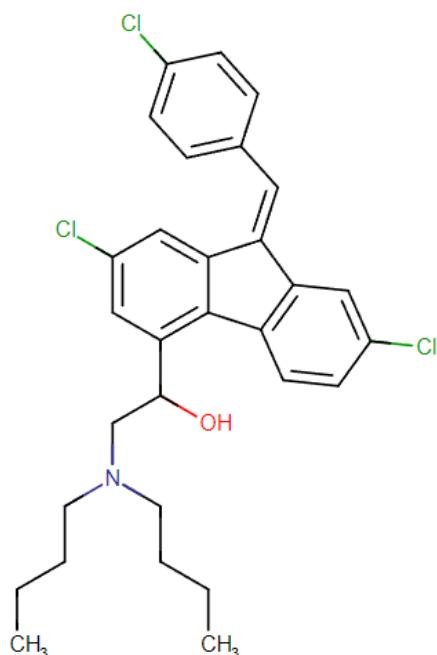


Figura 1: estrutura química da Lumefantrina (“Lumefantrine”, [s.d.])

Embora o uso de DSA seja muito efetivo para o aumento da solubilidade e manter o fármaco em sua forma amorfa, existem desafios na produção de formulações amorfas eficientes, tais como: a seleção de polímeros capazes de formar e estabilizar o fármaco na forma amorfa e formas de prever a ocorrência de recristalização durante o tempo de prateleira. Para tal, é necessárias metodologias capazes de caracterizar os sistemas amorfos com precisão. Uma técnica muito comum usada é a análise por difração de raios X pelo método do pó, na qual as amostras são irradiadas com uma fonte de raios X, que são difratados pelos diferentes planos cristalinos da amostra, permitindo assim analisar a estrutura tridimensional de um material cristalino. Porém, tal técnica analítica quando realizada em difratômetros convencionais é incapaz de diferenciar estruturas amorfas de estruturas nanocristalinas, isto ocorre devido ao alargamento dos padrões raios X, tornando-o ineficaz para identificar os empacotamentos estruturais locais (ex. aglomerados

nanocristalinos), além da baixa resolução e interferência do background (BILLINGE, 2015). A presença de tais clusters nanocristalinos podem desestabilizar as formulações, acelerando a recristalização no decorrer da vida de prateleira do produto e prejudicar a biodisponibilidade.

Assim, para permitir o estudo aprofundado de estruturas amorfas é necessário o uso de um método capaz de extrair informações da natureza desorganizada de tais sistemas amorfos e analisá-los com uma maior resolução. Para este propósito vem sendo utilizado o método de *Pair Distribution Function* (PDF) em combinação com análises de Difração de raios X de alta energia obtidas em fontes de luz sincrotron.

O método PDF, inicialmente utilizado com sucesso em materiais inorgânicos, tem atualmente demonstrando alto potencial no estudo de medicamentos. Tal metodologia consiste no tratamento de resultados obtidos do método de Difração de raios X de alta energia sobre a amostra a ser estudada para em seguida poder determinar a probabilidade de se encontrar um determinado átomo a uma distância R de algum outro átomo, podendo assim determinar a estrutura inter e intramolecular da amostra. A base do método é a intensidade espalhada por uma amostra, que corrigida para artefatos não-estruturais como espalhamento do porta-amostra, absorção da amostra, fator Lorentz-polarização, espalhamento inelástico (Compton) e normalizada para unidades atômicas (I_a), é utilizada para se obter a função de estrutura do espalhamento total $S(Q)$ (equação E-1):

$$S(Q) = \frac{I_a(Q) - [\langle f^2 \rangle - \langle f \rangle^2]}{\langle f \rangle^2} \quad (\text{E-1})$$

A transformada de Fourier da função $S(Q)$ fornece a função PDF reduzida total $G(R)$, representada pela equação E-2.

$$G(R) = (2/\pi) \int_0^{\infty} Q [S(Q) - 1] \sin(QR) dQ \quad (\text{E-2})$$

Na Figura 2 é mostrado um exemplo de padrão PDF característico de uma amostra de sistema DSA. Nesta figura, são apresentadas as informações a nível intra e intermoleculares que foram extraídas dos padrões PDF por meio dos fatores peso e dos PDF's simulados das correlações atômicas individuais. A partir das análises, é possível, por exemplo, diferenciar a contribuição de cada par atômico a nível intramolecular. Pelo método também é possível determinar variações nas regiões intermoleculares, onde ocorrem as

interações fármaco/polímero que promovem as expansões ou contrações das cadeias poliméricas. Para alguns sistemas, tais variações podem influenciar no processo de difusão das moléculas do fármaco, o que muda, consequentemente, propriedades como solubilidade, dissolução e estabilização do medicamento.

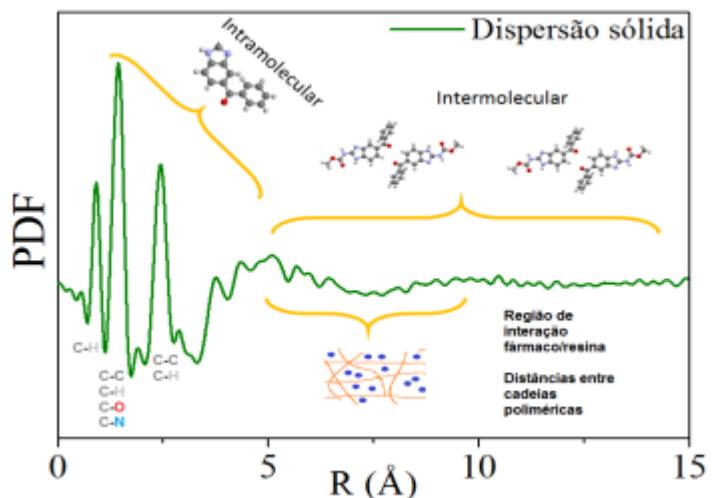


Figura 2 – Padrão PDF de uma amostra de sistema DSA com algumas das informações possíveis de se obter. (NONATO BEZZON, 2017)

Araujo et al. (DE ARAUJO; BENMORE; BYRN, 2017) demonstraram que é possível utilizar o método PDF, junto de difração de raios X de alta energia, para comparar a viabilidade de diferentes DSAs do fármaco lapatinib e determinar a possibilidade de recristalização das diferentes formulações estudadas. Em um outro estudo feito por Nollenberger et al. (NOLLENBERGER et al., 2009), o método PDF foi usado para comprovar o estado amorfó de formulações de felodipina produzidas por hot melt extrusion, algo que não foi possível se determinar pelos métodos usuais. A utilização do método PDF possibilita não somente o estudo científico de fármacos e formulações já existentes, como também facilitaria a criação de novas formulações. Assim, a análise pelo método PDF tem o potencial de prever a cristalização e acelerar o desenvolvimento de novas formulações, permitindo a análise de polímeros compatíveis para novas DSAs de maneira mais rápida e eficiente (BEZZON; FERREIRA; ARAUJO, 2019).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é avaliar a estrutura local de dispersões sólidas amorfas de fármacos de baixa solubilidade, em especial para o fármaco lumefantrina, focando

especificamente em aspectos estruturais (regiões amorfas ou cristalinas). É desejado avaliar a possibilidade da utilização de métodos teóricos inovadores, por meio do método PDF, e métodos analíticos estatísticos, por meio do método PCA, para a otimização e aprimoramento de tais avaliações e, com isso, que haja uma facilitação no processo de selecionar polímeros que garantam uma amorfização eficiente e direcionem o desenvolvimento de formulações estáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e análise dos dados

3.1.1 MATERIAIS

Metanol (MeOH) e diclorometano (DCM) foram adquiridos da Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA). A base livre de Lumefantrina foi comprada da LC Laboratories (Woburn, MA). HPMC-E3 (hidroxipropil metilcelulose, Methocel® E3) e HPMCP (HP-55) usados nas dispersões de Lumefantrina foram obtidos da empresa Colorcon (West Point, PA, EUA) e Shin-Etsu Chemical Company (Tóquio, Japão), respectivamente. A tabela abaixo mostra, de maneira simplificada, a Função e procedência dos materiais usados nos experimentos

Quadro 2: Materiais utilizados e seus fabricantes

Material	Função	Fabricante
Metanol (MeOH)	Solvente	Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA)
Diclorometano (DMC)	Solvente	Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA)
Lumefantrina	Ingrediente Farmacêutico Ativo	LC Laboratories (Woburn, MA)
HPMC-E3 (hidroxipropilmetilcelulose , Methocel® E3)	Polímero	Colorcon (West Point, PA, USA)
HPMCP (HP-55)	Polímero	Shin-Etsu Chemical Company (Tokyo, Japan)

3.1.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS POR SPRAY-DRYING

A Lumefantrina e os polímeros foram solubilizados sob agitação em uma solução 70/30 (v/v) de DCM/MeOH em uma concentração de sólidos de 2% (m/v). Proporções diferentes (m/m) de fármaco-polímero foram usados da seguinte maneira: 1:0 (fármaco puro), 3:1, 1:1, 1:3 and 0:1 (polímero puro). As soluções foram criadas em um spray drier do tipo Büchi-B190 spray dryer (Büchi, Suíça) nas seguintes condições: Temperatura de entrada de 75 °C; temperatura de saída de 45 °C; fluxo do aspirador 400 (unidades arbitrárias), taxa de alimentação da bomba 5 mL/min. O pó foi armazenado em frascos de vidro selados e mantido sob refrigeração até a realização da análise de difração de raios X (XRPD) e análise de raios X de alta energia. Em seguida, as amostras foram armazenadas em condições ambientais por 100 dias e re-analisadas por difração de raios X do pó (XRPD).

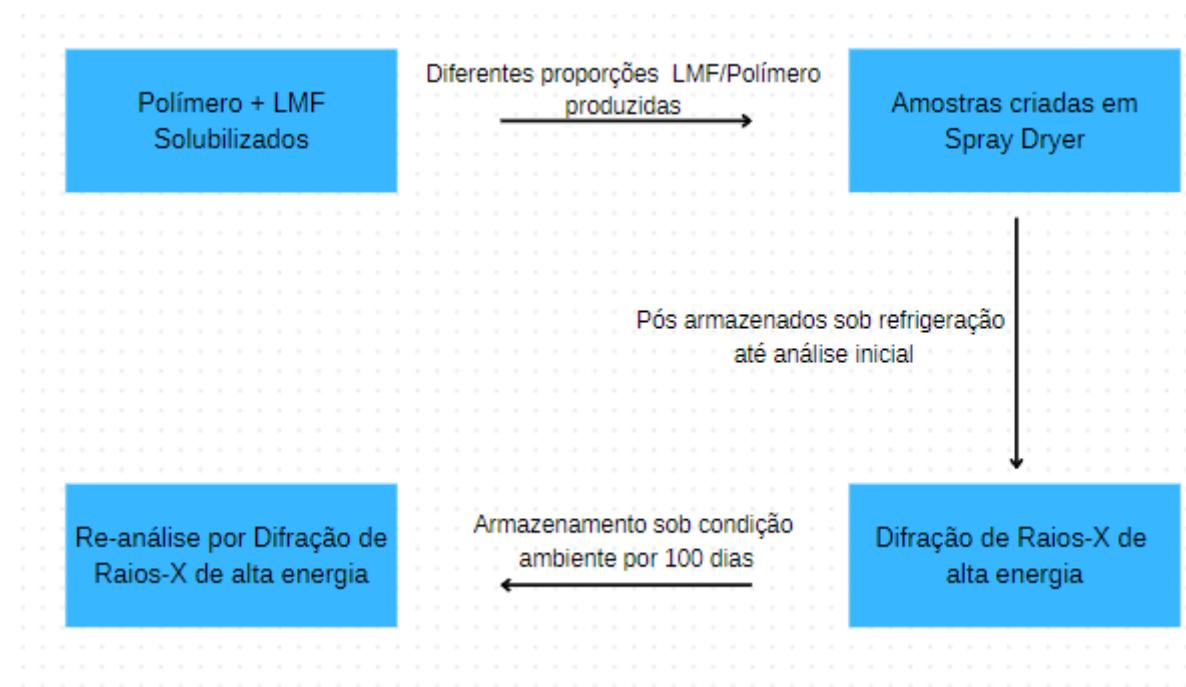


Figura 3: Fluxograma do preparo e análise das amostras utilizadas

3.1.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM LABORATÓRIO

Os padrões de difração de raios X foram medidos em um difratômetro Siemens/Bruker D5000, na linha de feixe 6-ID-D na Fonte de Fótons Avançada, Laboratório Nacional Argonne (EUA), com energia incidente de 100.268 KeV (comprimento de onda

0.12365 Å), usando radiação K_a filtrada por Ni ($\lambda = 1,5418$ Å). Os dados foram coletados utilizando-se uma tensão de aceleração de 40 kV e uma corrente de tubo de 40 mA, tamanho do passo de 0,02, tempo de passo de 5 s na faixa angular de $4^\circ < 2\theta < 40^\circ$

3.1.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE ALTA ENERGIA

Amostras de polímero fármaco foram montadas em tubos de polimida (Cole-Parmer®, Vernon Hills, IL, EUA) com diâmetros interno e externo de 0,0710 e 0,0750 polegadas, respectivamente. Os experimentos de raios X de alta energia foram conduzidos na Linha de Luz 6-ID-D no Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory usando um feixe monocromático de energia de 100,315 keV (0,12360(5) Å) e 0,5 mm × 0,5 mm de tamanho para minimizar a absorção e o espalhamento múltiplo na amostra e atingir altos Q-values. Raios-x dispersos foram detectados usando um detector de área de silício amorfo XRD1621 Perkin Elmer. A distância amostra-detector de 332,9 mm foi calibrada usando uma amostra de pó de CeO₂ padrão NIST.

3.1.5 ANÁLISE PDF

Os padrões de espalhamento 2D para todas as amostras foram integrados usando DawnScience e os fatores de estrutura de raios X S(Q) e funções de correlação de pares G(r) foram obtidos usando PDFgetX2. As correspondentes funções de distribuição de pares diferenciais D(r) foram obtidas por uma transformação de Sine Fourier usando o formalismo HHS como descrito por Keen³⁴ e Susman et al.¹⁸, onde,

$$D(r) = \frac{2r}{\pi} \int_0^{Q_{max}} Q^2 [S(Q) - 1] \frac{\sin Qr}{Qr} dQ \quad (3)$$

3.1.6 ANÁLISE PCA

Os dados obtidos foram organizados e formatados usando o software OriginLab e analisados usando o Minitab (Minitab, Colégio Estadual, PA). Devido a limitações do software, foi necessário determinar um intervalo de aproximadamente dois mil pontos para a PCA, optou-se por estudar o intervalo de 6-12 Å, pois a maioria das interações intermoleculares são mostradas nessas faixas. Os parâmetros PC1, PC2 e PC3,

responsáveis por mais de 85% dos dados, foram então usados para criar um gráfico de dispersão 3D com o intuito de melhor separar os resultados das amostras

MÉTODOS

3.2.1 Difração de Raios-x de alta energia

A Difração de Raios X de Alta Energia (DXAE) é uma técnica utilizada para estudar a estrutura cristalina de materiais. Usando raios X de alta energia, geralmente acima de 30 keV, esta técnica permite uma penetração mais profunda no material, permitindo analizar amostras espessas ou, no caso deste projeto, estudar a estrutura interna do material. Ao atingirem o material sendo estudado, os raios X interagem com os átomos na estrutura cristalina, o que acarreta em sua dispersão em direções específicas. Cada composto cristalino possui uma estrutura singular, com sua célula unitária sendo diferente de outros materiais ou até mesmo de outro polimorfo do mesmo composto. Tal característica gera uma dispersão similar a uma “Impressão Digital” do material, permitindo que seja determinado não somente qual está presente, mas também torna possível se calcular o grau de cristalinidade da amostra. A característica de materiais amorfos, por outro lado, é a aleatoriedade da organização das partículas em sua estrutura, o que acarreta em uma dispersão caótica dos Raios X incidentes(EPP, 2016).

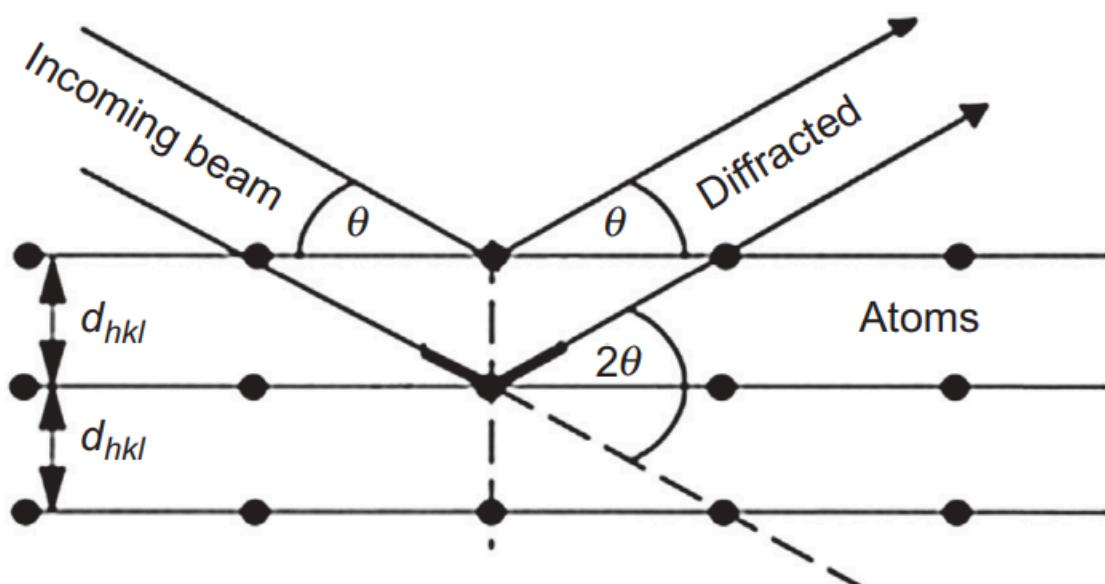


Figura 4: Raios X sendo dispersos por uma amostra cristalina (SPIESS et al., 2019).

O processo se inicia com um emissor dedo tipo sincrotron liberando Raios X com comprimentos de onda controlados sobre a amostra em questão, que em seguida reflete os raios e os dispersa de maneira baseada em sua estrutura interna como discutido anteriormente. Padrão de difração gerado é então coletado por um detector e transformado em um mapa bidimensional de difração de Raios X, que pode ser estudado ou ter seus dados tratados para uma forma gráfica mais comum. Tais mapas demonstram a maneira com qual a amostra dispersou os raios X incidentes, logo, como explicado anteriormente, o mesmo será completamente diferente se comparado ao mapa gerado por um outro cristal ou amostra amorfa. Isto permite avaliar a composição qualitativa e quantitativa da amostra, assim como o grau de cristalinidade da mesma. Além disso, a precisão da técnica permite avaliar até mesmo características como a distância entre planos atômicos e a orientação dos cristais.

A principal diferença entre a Difração de Raios-X convencional e a de Alta Energia se dá na capacidade de penetração dos mesmos. Os Raios-X liberados na difração convencional não possuem energia necessária para penetrar profundamente o material a ser analisado, acarretando, neste caso, em leituras com grande quantidade de ruído e interferência de background, o que impede uma leitura precisa e torna impossível o tratamento correto dos dados. A Difração de Alta Energia, por outro lado, é capaz de coletar resultados com maior informação das interações intra e intermoleculares, enquanto também minimizando interferências de artefatos, o que permite o tratamento subsequente dos dados pelas outras técnicas mencionadas neste trabalho.

3.2.2 Análise de Principal Component Analysis

A PCA é uma técnica estatística amplamente utilizada para reduzir a dimensionalidade de grandes conjuntos de dados, preservando ao máximo a variabilidade presente nos dados originais. Este método é especialmente útil em contextos onde os dados contêm muitas variáveis inter-relacionadas, o que pode dificultar a análise direta ou visualização. A PCA transforma as variáveis originais em um novo conjunto de variáveis, chamadas de componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais.

O processo da PCA começa com a centralização dos dados, subtraindo a média de cada variável, de modo que os dados centralizados tenham média zero. Em seguida,

calcula-se a matriz de covariância dos dados centralizados, que fornece informações sobre a variabilidade conjunta entre as variáveis. A matriz de covariância é uma peça chave, pois suas propriedades definem a direção e a magnitude da variabilidade no espaço dos dados (“Principal Component Analysis for Special Types of Data”, 2002).

Para determinar as direções principais de variação nos dados, a PCA faz uso dos autovetores e autovalores da matriz de covariância. Os autovetores correspondem às direções principais, enquanto os autovalores indicam a quantidade de variabilidade explicada em cada direção. Em outras palavras, os autovetores definem os eixos dos componentes principais, e os autovalores indicam a importância relativa de cada componente.

Os componentes principais são ordenados de acordo com seus autovalores, do maior para o menor. O primeiro componente principal (PC1) é a direção que captura a maior parte da variabilidade nos dados. O segundo componente principal (PC2) é ortogonal ao primeiro e captura a maior parte da variabilidade restante, e assim por diante. Este ordenamento permite que o analista escolha quantos componentes principais são necessários para explicar uma proporção significativa da variabilidade dos dados originais, reduzindo, assim, a dimensionalidade do problema (HAIR, 2009).

PCA é muito útil em visualização de dados. Em conjuntos de dados com muitas dimensões, é difícil visualizar os dados diretamente. No entanto, ao reduzir o número de dimensões para duas ou três, utilizando os primeiros componentes principais, é possível criar gráficos que capturam a essência dos dados, facilitando a identificação de padrões, agrupamentos e outliers. Neste caso, foi possível utilizar o método para facilitar a determinação de características estruturais das amostras, simplificando uma análise minuciosa e demorada em um processo mais automatizável e eficiente.

3.2.3. Análise estatística

Os arquivos foram então tratados através do software DawnScience, transformando as informações obtidas em dados de espalhamento total, posteriormente, os dados foram tratados com o software PDFgetX2, criando os arquivos S(Q) e G(r), que por sua vez foram carregados em OriginLab, transformados em gráficos e os arquivos de texto dos referidos gráficos foram inseridos no Minitab, utilizando-os como base para a análise do PCA. Os dados 2D obtidos foram integrados em um conjunto de dados 1D utilizando as rotinas no software DAWN (FILIK et al., 2017). A função de estrutura foi extraída utilizando o software PDFgetX2 (QIU; THOMPSON; BILLINGE, 2004), considerando um Q-range de 0 a 20 Å⁻¹

para o S(Q) na utilização da transformada de Fourier. O processo de extração da função de estrutura foi repetido com o software PDFgetX3 (JUHÁS et al., 2013), utilizando os mesmos arquivos de dados e Q-range para a utilização da transformada de Fourier. Os dados do polímero puro (10LAP), das duas amostras de lapatinib puro parcialmente cristalizado (1LAP/6LAP), da lumefantrina pura amorfa (9LMFA/B) e da lumefantrina pura cristalizada (8LMFA/B) refinadas pelo software PDFgetX3 foram usados para criar dois scatterplots diferentes pela a utilização do método PCA. Com a utilização das metodologias mencionadas, foi possível utilizar o método de PCA mencionado para fazer a transformação ortogonal necessária e transformar as variáveis possivelmente relacionadas em variáveis não relacionadas para ordená-las. Neste segundo momento foi utilizado o software MatLab para a aplicação do PCA, utilizando os dados G(r) gerados pelo software PDFgetX3, sendo feita a junção de todos os dados das amostras em um único conjunto e separando os resultados de PCA obtidos em gráficos de dispersão 3D (Figuras 5 e 6).

4. RESULTADOS

Foi avaliada a viabilidade da aplicação da PCA para fazer a separação eficaz de diferentes dispersões similares e diferentes estruturas tridimensionais, o que diminuiria significativamente o tempo necessário para se estudar uma determinada amostra ou possível nova formulação em um ambiente de pesquisa. Todas as medições feitas para as diferentes dispersões foram agrupadas e então tratadas com o método PCA, sendo necessário a escolha de um intervalo menor do raio r(A) graças a limitações do software. Foi escolhido o intervalo de 6 a 12 Å para a análise, pois nesse intervalo está distante da região sujeita a erros instrumentais e é também onde se encontra a maioria das diferenças entre as interações intermoleculares nas amostras. Após determinado o intervalo, foi feito o PCA definindo as variáveis como cada um dos pontos de r(A) entre 6 e 12 Å com um intervalo de 0,01 Å entre os pontos e utilizando 3 componentes principais para ordená-los. Após feito o PCA foi criado um gráfico de dispersão tridimensional com o software Minitab separando as amostras. As Figuras 4 e 5 apresentam os gráficos 3D de dispersão (PC1, PC2, PC3) obtidos e demonstra que a análise de PCA foi capaz de agrupar consistentemente as replicatas e, também, as dispersões semelhantes. Além de ser consistente em sua análise, o método também foi capaz de detectar outliers nos conglomerados da amostra.

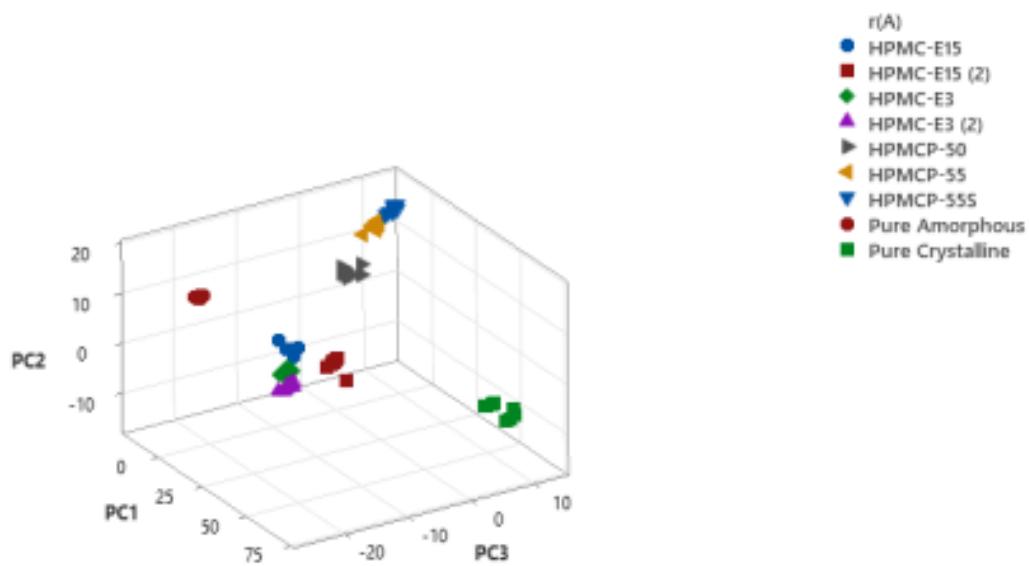


Figura 5: Gráfico gerado pelo método PCA mostrando resultados de cristalinidade de amostras de Lumefantrina Amorfa, Cristalina e DSAs de Lumefantrina e diferentes polímeros

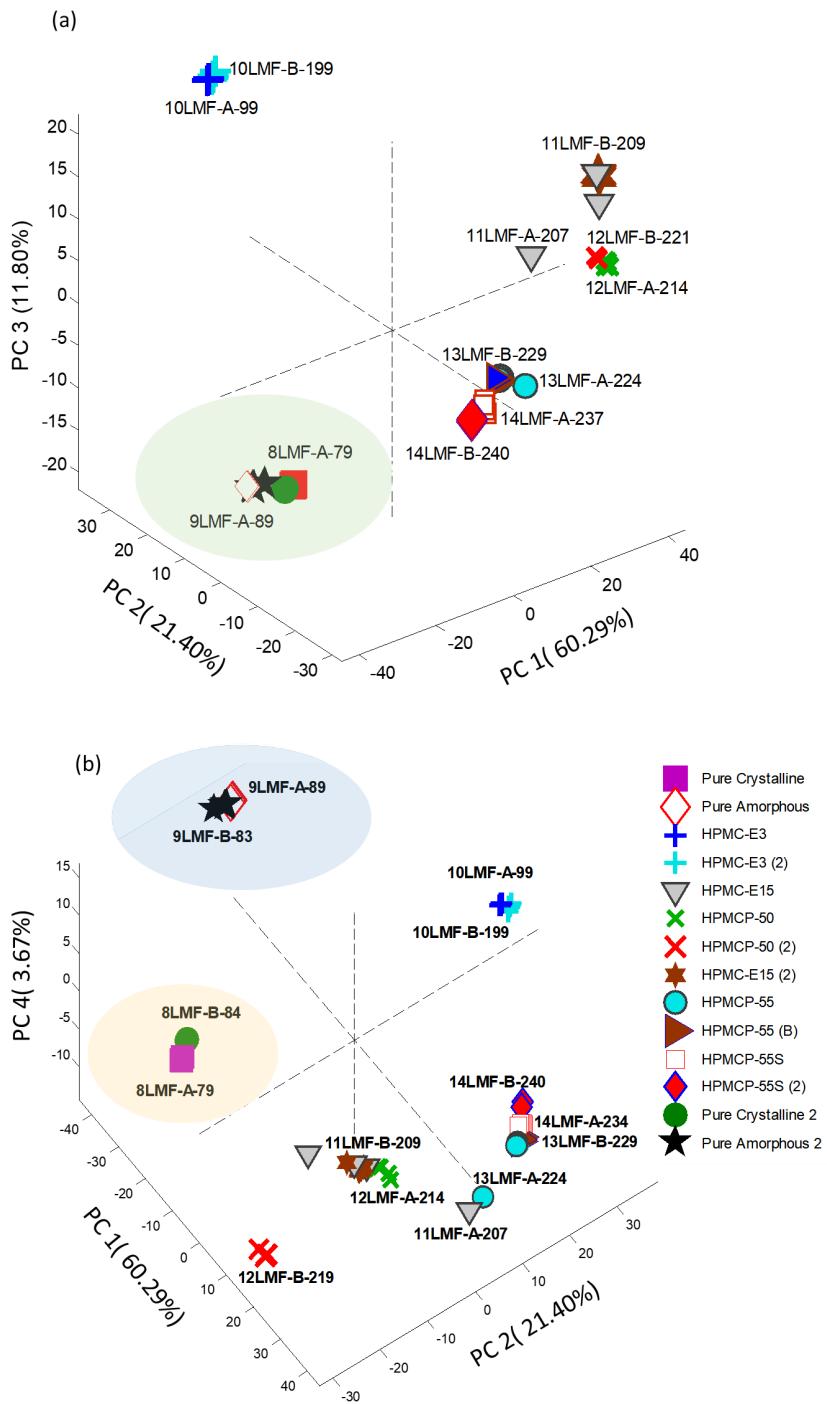


Figura 6: Gráfico de dispersão PC1xPC2xPC3 dos padrões de PDF de amostras de LMF pura (cristalina e amorfa) e de DSA de LMF e polímeros derivados de hidroxipropilmetilcelulose.

5. DISCUSSÃO

Como pode ser visto na Figura 4, a aplicação do PCA possibilitou separar as dispersões de maneira eficiente e confiável, com as amostras puras distanciadas das dispersões e com a amostra cristalina ainda mais distante das demais, e organizando as

dispersões similares com menores distâncias entre si, sendo possível observar uma distinção clara entre as misturas e entre os grupos de amostras contendo polímeros de HPMC e HPMCP. Este resultado demonstra um futuro promissor na utilização das técnicas de difração de raio X de alta energia, Pair Distribution Function em combinação com a PCA na determinação, estudo e análise de dispersões amorfas. Tal abordagem pode vir a ser uma ferramenta poderosa tanto para a área de pesquisa quanto para a indústria na criação de novas formulações farmacêuticas.

Além disso, foi possível avaliar resultados obtidos por diferentes softwares analíticos (PDFgetX2 e PDFgetX3), demonstrando a reprodutibilidade da análise. O programa PDFgetX2 permite um refinamento manual dos dados, no qual o usuário deve introduzir os parâmetros de análise, permitindo assim um maior controle e escolha do que refinar; porém, este se torna mais suscetível a erros de usuário. O PDFgetX3 por outro lado utiliza um algoritmo para a análise e escolha de parâmetros, retirando o controle das mãos do usuário, mas tornando o processamento dos dados significativamente mais rápido e simples. Ao se observar os gráficos de dispersão se tornam claras algumas diferenças entre os tratamentos. Embora ambos os softwares se gerar padrões de PDF semelhantes, os dados gerados pelo PDFgetX3 propiciaram agrupá-las de maneira mais efetiva como, por exemplo, as amostras 113LMF e 14LMF (ambas de Lumefantrina com o polímero HPMCP 55) sendo plotadas juntas no plano, porém ainda às distanciando da amostra 9LMF (Lumefantrina amorfa pura). Além disso, os resultados apresentaram menos outliers, como o visível na amostra 11LMF. Com isso, é possível concluir que o software PDFgetX3 parece se apresentar como o mais vantajoso no uso para análise de resultados de PDF. Porém, maiores análises são necessárias para avaliar a coerência e sentido físico dos padrões gerados por ambos os softwares.

6. CONCLUSÃO

O projeto permitiu explorar a aplicabilidade do método PDF em conjunto com dados de difração de raios X de alta energia obtida em fonte de luz sincrotron para avaliar a estrutura local de dispersões amorfas de lumefantrina e lapatinibe. Foi possível constatar a completa amorfização das dispersões sólidas e identificar diferenças nas regiões intermoleculares em função da interação com os polímeros ácidos derivados de hidroxipropilmetilcelulose. Em uma abordagem inovadora, utilizou-se a PCA com a construção de gráficos de dispersão PC1x PC2xPC3 para avaliação dos padrões de PDF. Concluiu-se que tal abordagem é muito promissora para solucionar o problema de tratamento da grande quantidade de dados gerados nesses ensaios e para diferenciar

dispersões sólidas muito semelhantes em relação à cristalinidade e tipo polímero utilizado. Demonstrou-se que essa abordagem tem potencial para ser uma ferramenta útil para selecionar e diferenciar formulações, em aplicações de engenharia reversa e de previsão da estabilidade, auxiliando o desenvolvimento de formulações. Ainda foi possível investigar pela aplicação do PCA diferenças entre os dados gerados entre os softwares mais frequentemente utilizados nos refinamentos, indicando necessidade de mais estudos para maior compreensão da confiabilidade dos resultados.

Esta aplicação da metodologia usada poderia ser utilizada em diversas áreas da indústria farmacêutica. Principalmente, seria possível utilizar estes métodos no controle de qualidade e estudos de estabilidade do desenvolvimento de medicamentos. Seria possível iniciar uma análise das amostras diretamente após sua produção, com uma segunda análise sendo feita com as mesmas amostras após aplicação de um teste de Estabilidade ou Estabilidade acelerada, em seguida comparando os dados obtidos para avaliação de possíveis processos de recristalização da amostra. Seria possível também a utilização do método para analisar novas formulações com o intuito de averiguar sua cristalinidade, podendo usa-lo como uma forma de controle de qualidade, garantindo a confiabilidade das características físicas das estruturas das amostras.

Embora os estudos sobre o uso de Pair Distribution Function, e especialmente seu uso em conjunto com as outras técnicas utilizadas neste trabalho, estejam ainda em seus primórdios, ele se mostra promissor como uma ferramenta potente para diferentes áreas de farmácia, e embora sejam necessários refinamentos nos métodos para seu uso mais amplo, existe a possibilidade dos mesmos virem a se tornar parte significativa do desenvolvimento de medicamentos e análises cristalográficas no futuro

7. REFERÊNCIAS

BEZZON, V. D. N.; FERREIRA, F. F.; ARAUJO, G. L. B. **Disordered structures under the ordered context: hypromellose-loaded drug for bioapplication characterized by PDF analysis.** Proceedings of the 18. Brazil MRS Meeting 2019. **Anais...**2019. Disponível em: <https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:51049642>. Acesso em: 26 ago. 2024

BILLINGE, S. J. Atomic Pair Distribution Function: A Revolution in the Characterization of Nanostructured Pharmaceuticals. **Nanomedicine**, v. 10, n. 16, p. 2473–2475, ago. 2015.

BONAMICI, D. Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisenções. **São Paulo**, 2009.

DE ARAUJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de**

Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 33, n. 1, 2012.

DANILO NONATO BEZZON, V. DISPERSÕES SÓLIDAS DE CLORIDRATO DE VERAPAMIL EM MATRIZ POLIURETÂNICA PARA APLICAÇÃO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E APLICAÇÃO DO MÉTODO PDF. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA: [s.n.].

DE ARAUJO, G. L.; BENMORE, C. J.; BYRN, S. R. Local structure of ion pair interaction in lapatinib amorphous dispersions characterized by synchrotron X-ray diffraction and pair distribution function analysis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 46367, 2017.

EPP, J. X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. Em: **Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 81–124.

FILIK, J. et al. Processing two-dimensional X-ray diffraction and small-angle scattering data in DAWN 2. **Journal of applied crystallography**, v. 50, n. 3, p. 959–966, 2017.

HAIR, J. F. **Análise multi variada de dados**. [s.l.] Bookman Editora, 2009.

JUHÁS, P. et al. PDFgetX3: a rapid and highly automatable program for processing powder diffraction data into total scattering pair distribution functions. **Journal of applied crystallography**, v. 46, n. 2, p. 560–566, 2013.

Lumefantrine. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB06708>>. Acesso em: 27 ago. 2024.

MAKANGA, M.; KRUDSOOD, S. The clinical efficacy of artemether/lumefantrine (Coartem®). **Malaria Journal**, v. 8, n. S1, p. S5, dez. 2009.

NAZARETH JÚNIOR, E. M. et al. Development and characterization of efavirenz amorphous solid dispersions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 20- res, 2018.

NOLLENBERGER, K. et al. Pair distribution function X-ray analysis explains dissolution characteristics of felodipine melt extrusion products. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 4, p. 1476–1486, 2009.

Principal Component Analysis for Special Types of Data. Em: **Principal Component Analysis**. Springer Series in Statistics. New York: Springer-Verlag, 2002. p. 338–372.

QIU, X.; THOMPSON, J. W.; BILLINGE, S. J. PDFgetX2: a GUI-driven program to obtain the pair distribution function from X-ray powder diffraction data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 37, n. 4, p. 678–678, 2004.

RAGHAVAN, S. L. et al. Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers. **International journal of pharmaceutics**, v. 212, n. 2, p. 213–221, 2001.

SPIESS, L. et al. **Moderne Röntgenbeugung: Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker**. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2019.

TCHAPARIAN, E. et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine in young Ugandan children treated with artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 8, p. 1243–1251, 2016.

YASIR, M. et al. Biopharmaceutical classification system: An account. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1681–1690, 2010.

8. ANEXOS

Não houveram necessidades de aprovações por Comitês de Ética ou comitês similares.

Data e assinatura do aluno(a)

Data e assinatura do orientador(a)