

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOSUÉ MALAQUIAS DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÃO SÓLIDA PARA
POTENCIAL AUMENTO DE SOLUBILIDADE DE METOTREXATO**

ALFENAS-MG

2024

JOSUÉ MALAQUIAS DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÃO SÓLIDA PARA
POTENCIAL AUMENTO DE SOLUBILIDADE DE METOTREXATO**

Dissertação de Mestrado de Josué Malaquias de Almeida para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, na Área de Desenvolvimento e avaliação de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho.

Co-orientadora: Dra. Sandra Barbosa N. Agostini.

ALFENAS-MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Almeida, Josué Malaquias de .

Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida para potencial aumento de solubilidade de metotrexato / Josué Malaquias de Almeida. - Alfenas, MG, 2024.

63 f. : il. -

Orientador(a): Flávia Chiva Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Metotrexato. 2. Solubilidade. 3. Classe IV. 4. Dispersão sólida. 5. Método de preparação. I. Carvalho, Flávia Chiva, orient. II. Título.

JOSUÉ MALAQUIAS DE ALMEIDA

"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÃO SÓLIDA PARA POTENCIAL AUMENTO DE SOLUBILIDADE DE METOTREXATO"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 11 de dezembro de 2024.

Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia Trevisan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Rudy Bonfilio
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Chiva Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2024, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1410150** e o código CRC **4C093A2B**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UNIFAL – MG o apoio prestado para que ocorresse a execução e a finalização deste trabalho científico.

Meu agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL – MG e, em especial, à coordenadora Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco e ao vice-coordenador Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por possibilitar a execução e a finalização deste trabalho científico.

Meus agradecimentos aos Laboratórios LATF, LPMF, LQFAR, LabCRI e, em especial, ao LSLF e NCQ, por terem me acolhido e apoiado na execução deste trabalho científico.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Sandra Barbosa Neder Agostini o apoio, a dedicação e a paciência para que este trabalho científico fosse realizado e concluído.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho o apoio, a confiança, a dedicação, o incentivo e a paciência para que este trabalho científico fosse realizado e concluído e por contribuir para minha formação acadêmica e científica. E também quero expressar a minha gratidão a ela.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Introdução: O metotrexato (MTX) é amplamente utilizado no tratamento de doenças autoimunes e cânceres, mas enfrenta desafios devido à sua baixa solubilidade e permeabilidade, limitando sua biodisponibilidade oral. Embora a dispersão sólida seja um método comum para melhorar a solubilidade do medicamento, a sua eficácia para o MTX permanece pouco explorada. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar dispersões sólidas de MTX para aumentar sua solubilidade. **Métodos:** Dispersões sólidas de MTX foram preparadas com os polímeros Poloxamer 407, PVP-K30 e PEG 6000 pelo método de evaporação do solvente. A caracterização foi realizada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios X de pó (PXRD) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Um método analítico por espectrofotometria UV foi desenvolvido e validado para o teste de solubilidade, os quais foram realizados em tampão fosfato pH 6,8, comparando as dispersões com o MTX livre e as respectivas misturas físicas. **Resultados:** As análises de PXRD indicou amorfização do MTX em uma dispersão, porém, a sua mudança estrutural em outra dispersão necessita de análises adicionais para confirmação. O método analítico validado mostrou linearidade, precisão, exatidão dentro dos limites regulatórios. Os testes de solubilidade mostraram que as dispersões sólidas de MTX não aumentaram a solubilidade em relação ao fármaco livre, sugerindo que apenas a amorfização pode não melhorar a solubilidade do MTX. Este resultado está alinhado com estudos anteriores que encontraram ganhos mínimos de solubilidade com dispersões sólidas de MTX na forma cristalina e no estado amorfo. **Conclusão:** Os resultados sugerem que, embora as dispersões sólidas de MTX amorfo sejam viáveis, elas podem não fornecer uma vantagem significativa de solubilidade. Abordagens alternativas, como a nanoencapsulação, podem oferecer soluções mais eficazes para melhorar a biodisponibilidade do MTX, orientando pesquisas futuras em sistemas de liberação de fármacos.

Palavras-chave: Metotrexato; Solubilidade; Classe IV; Dispersão sólida; Método de preparação.

ABSTRACT

Introduction: Methotrexate (MTX) is widely used in the treatment of autoimmune diseases and cancers but faces challenges due to its low solubility and permeability, limiting its oral bioavailability. Although solid dispersion is a common method for improving drug solubility, its effectiveness for MTX remains underexplored. **Objective:** This study aimed to develop and evaluate MTX solid dispersions to increase its solubility through induced amorphization. **Methods:** Amorphous MTX solid dispersions were prepared with the polymers Poloxamer 407, PVP-K30, and PEG6000 using the solvent evaporation method. Characterization was conducted via differential scanning calorimetry (DSC), powder X-ray diffraction (PXRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) to confirm amorphization. A UV spectrophotometry analytical method was developed and validated for the solubility test, which was conducted in pH 6,8 phosphate buffer, comparing the dispersions with free MTX and corresponding physical mixtures. **Results:** The PXRD analyses indicated amorphization of MTX in one dispersion, however, its structural change in another dispersion needs additional analysis for confirmation. The validated analytical method demonstrated linearity, precision, and accuracy within regulatory limits. Solubility tests showed that amorphous MTX solid dispersions did not increase solubility relative to the free drug, suggesting that amorphization alone may not improve MTX solubility. This finding aligns with previous studies that observed minimal solubility gains with solid MTX dispersions in crystalline form and in the amorphous state. **Conclusion:** The results suggest that while amorphous MTX solid dispersions are feasible, they may not provide a significant solubility advantage. Alternative approaches, such as nanoencapsulation, may offer more effective solutions for improving MTX bioavailability, guiding future research in drug delivery systems.

Keywords: Methotrexate; Solubility; Class IV; Solid dispersion; Method of preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de preparo de dispersão sólida pela técnica de evaporação do solvente.....	16
Figura 2 -	Estrutura molecular do metotrexato.....	22
Figura 3 -	Espectro de absorção na região do ultravioleta da amostra contendo MTX (preto), PVP K-30 (vermelho), P407 (azul) e PEG 6000 (verde) a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol.....	39
Figura 4 -	Curva analítica do MTX em metanol, obtida por espectrofotometria a 298 nm.....	40
Figura 5 -	Plotagem dos resíduos ao redor do eixo x (A) e plotagem simultânea da área experimental e da área calculada (B)	41
Figura 6 -	Dispersões sólidas de DGME, P188, P407, PVP K-30 e PEG 6000 após a secagem. DSs de B até I: contêm DGME e/ou P188; DSs K até R: contêm P407 e/ou PVP K-30; DSs S e T: contêm PEG 6000; DSs U e V: contêm P407 ou PVP K-30 e PEG 6000.....	44
Figuras 7 A e B -	Espectros de infravermelho: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 ou PVP K - 30 (dispersão sólida U ou V, em verde); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 ou PVP K - 30 (mistura física U ou V, em vermelho); dispersão sólida contendo somente polímeros PEG 6000 e P407 ou PVP K-30 (DS U ou V vazia, em cinza); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa);PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo). As estruturas químicas incluídas nas figuras são: metotrexato (C), Poloxâmero 407 (D), polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) (E) e polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) (F).....	46

Figuras 8 A e B -	<p>A: Curvas de calorimetria exploratória diferencial: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 (dispersão sólida U, em verde); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 (mistura física U, em vermelho); DS U vazia (em cinza); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo); B: Curvas de calorimetria exploratória diferencial: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e PVP K-30 (dispersão sólida V, em verde); DS V vazia (em cinza); mistura física de MTX com PEG 6000 e PVP K-30 (mistura física V, em vermelho); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e PVP K-30 (em roxo).....</p>	48
Figuras 9 A e C -	<p>Perfis de difratogramas: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 (dispersão sólida U ou V, em verde); dispersão sólida vazia contendo somente polímeros PEG 6000 e PVP K-30 (dispersão sólida vazia, em cinza); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 ou PVP K-30 (mistura física U ou V, em vermelho); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo). A e B foram expandidos de 6° para 12° 2θ (B e C, respectivamente) para mostrar um pico de MTX encontrado nas misturas físicas e ausente em DS U.....</p>	50
Figura 10 -	<p>Perfis de solubilidade das DSs U e V, das MFs U e V, do MTX livre e do MTX tratado com metanol em solução tampão pH 6,8.....</p>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Produtos farmacêuticos aprovados pelo FDA baseados na tecnologia de dispersão sólida.....	20
Tabela 2 -	Estratégias exploradas para aumentar a solubilidade do MTX e citadas na Literatura.....	25
Tabela 3 -	Delineamento experimental para o preparo das dispersões sólidas de metotrexato (MTX), Poloxâmero 188 (P188), dietilenoglicol monoetil éter (DGME), poloxâmero 407 (P407), polivinilpirrolidona K30 (PVPK30) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). O MTX foi incorporado a 0,7 mg.mL ⁻¹ em todas as amostras.....	33
Tabela 4 -	Teste de precisão intradia, com os valores de concentração das amostras calculadas, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).....	42
Tabela 5 -	Teste de precisão interdica ou intermediária, com os valores de concentração das amostras calculadas, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).....	42
Tabela 6 -	Estiramentos existentes nas dispersões sólidas U e V, nas misturas físicas correspondentes fármaco - polímeros, nas DSs U e V vazias, no MTX livre, no MTX tratado com metanol e nos polímeros P407, PEG 6000 e PVP K-30.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCS	-Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CCDC	-Cambridge Crystallographic Data Centre
CSD	-Cambridge Structural Database
DMARDs	-Drogas Modificadoras de Doença Reumática
DGME	-Dietilenoglicol monoetil éter ou Transcutol
DHFR	-Dihidrofolato redutase
DoE	-Delineamento experimental ou design de experimentos
DS	-Dispersão sólida
DSs	-Dispersões sólidas
DSC	-Calorimetria exploratória diferencial
FDA	-Food and Drug Administration
FPGS	-Enzima foli-poli- glutamato sintetase
FTIR	-Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HPMC	-Hidroxipropilmetilcelulose
HPLC	-Cromatografia líquida de alta eficiência
MEV	-Microscopia eletrônica de varredura
MF	-Mistura física
MFs	-Misturas físicas
MTX	-Metotrexato
P188	-Poloxâmero 188
P407	-Poloxâmero 407

PEG 6000	-Polietilenoglicol 6000
PUVA	-Radiação ultravioleta A com psoralênicos
PVP	-Polivinilpirrolidona
PVP K-30	-Polivinilpirrolidona K-30
PVPVA 64	-Copovidna
PXRD	-Difração de raios X de pó
QTPP	-Quality Target Product Profile
Tg	-Transição vítrea
TNF	-Fator de necrose tumoral
UV	-Ultravioleta
UVB	-Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Dispersão sólida (DS).....	16
2.1.1	Estabilidade física de dispersão sólida.....	17
2.1.2	Técnicas de preparação de dispersão sólida por evaporação do solvente..	18
2.1.3	Panorama do mercado de dispersão sólida.....	19
2.1.4	Delineamento experimental.....	21
2.1.5	Metotrexato.....	22
2.1.6	Excipientes com maior aplicabilidade no desenvolvimento de dispersões sólidas.....	26
3	OBJETIVOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Materiais.....	29
4.2	Equipamentos.....	29
4.3	Métodos.....	29
4.3.1	Validação de método analítico para quantificação de MTX por espectrofotometria UV.....	29
4.3.2	Seletividade.....	30
4.3.3	Linearidade.....	30
4.3.4	Exatidão.....	30
4.3.5	Precisão.....	30
4.3.6	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	31

4.3.8	Desenvolvimento da dispersão sólida.....	32
4.3.9	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)...	37
4.3.10	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	37
4.3.11	Difratometria de raios X.....	37
4.3.12	Estudo de solubilidade.....	37
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Seletividade.....	39
5.2	Linearidade.....	39
5.3	Exatidão.....	41
5.4	Precisão.....	41
5.5	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	42
5.7	Obtenção das dispersões sólidas.....	43
5.8	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	44
5.9	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	48
5.10	Difração de raios X.....	49
5.11	Estudo de solubilidade.....	51
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

O metotrexato (MTX) é um fármaco que inibe a diidrofolato redutase (DHFR), após sofrer poliglutamação intracelular por meio da enzima foli-poli-glutamato sintetase (FPGS), e outras enzimas dependentes de folato, fazendo com que ocorra uma superprodução de adenosina, levando assim a ocorrência de imunossupressão. Além disso, esse fármaco bloqueia vias de síntese de novos nucleotídeos. Portanto, esse fármaco antifolato apresenta efeito anti-inflamatório e antiproliferativo, sendo indicado para o tratamento de artrite reumatoide, psoríase e câncer (Torres, 2022; Yu *et al.*, 2020).

O MTX, fármaco com importantes indicações clínicas, é considerado um fármaco de classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), ou seja, apresenta baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade, resultando em biodisponibilidade baixa, dificultando as suas aplicações clínicas. Isso é devido a sua natureza hidrofóbica, que dificulta o desenvolvimento de formulações administradas por via oral (Raj Giri *et al.*, 2021).

Estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade do MTX podem ser encontradas e a maioria foca no desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados, como niossoma, complexo de inclusão, microemulsão, nanodispersão, nanoemulsão e nanossuspensão (Agafonov; Ivanov; Terekhova, 2021; Ashoor; Ghareeb, 2022; Demirbolat *et al.*, 2022; Giri *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2019; Moshikur *et al.*, 2021; Powar *et al.*, 2021; Giri *et al.*, 2021; Rajalingam *et al.*, 2020; Yousefi *et al.*, 2010).

A dispersão sólida (DS) é atualmente um método muito empregado e bastante estabelecido para aumentar a solubilidade e a dissolução de fármacos. Podem ser obtidas por técnicas como evaporação rotativa, extrusão por fusão, fusão, liofilização e spray-drying (ECH&CP, 2007; Hashemzadeh; Jouyban, 2022; Mir, Khalid Bashir; Khan, 2017; Nair *et al.*, 2020; Raj Giri *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2019). A aplicação da tecnologia de DS gera várias vantagens, principalmente para fármacos pouco solúveis em meio fisiológico, como as seguintes: aumento da superfície, aumento da molhabilidade, aumento da porosidade e amorfização das partículas. Todas essas vantagens fazem com que aumente a solubilidade e a taxa de dissolução do fármaco (Guntaka; Lankalapalli, 2019).

A composição de DSs normalmente contém o fármaco, polímeros, surfactantes e solubilizantes. O uso destes excipientes diminui a ocorrência de recristalização e melhora a estabilidade da formulação. Além disso, outros estudos demonstram que o uso da mistura de polímero e surfactante/solubilizante aumenta a molhabilidade ou induz a formação micelar, provocando conseqüentemente o aumento da estabilidade, solubilidade e dissolução (Nair *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2019). O emprego de surfactante no preparo de DS aumenta a

miscibilidade fármaco-polímero, reduz a recristalização e melhora a molhabilidade, que consequentemente aumenta a dissolução e a estabilidade física. A combinação com solubilizantes, como dietilenoglicol monoetil éter (DGME) também é relatada para melhorar a desintegração da DS (Chaudhari; Dugar, 2017; ECH&CP, 2007; Hashemzadeh, 2022; Mir, 2017; Nair *et al.*, 2020; Raj Giri *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2019).

De acordo com Chan e Gonda (1990) existem quatro variações do estado sólido do MTX, incluindo a amorfa, que pode ser mais solúvel que a forma hidrato e a tetragonal. Os autores obtiveram essa variação pela solubilização e secagem do MTX em metanol. Além dessas variações, o Cambridge Structural Database (CSD) reporta a existência de três outras formas estruturais diferentes do MTX, sendo as seguintes: duas formas tetrahidratadas (números de depósito: 1143754 e 1143755; grupo espacial: $P 4_1 2_1 2 (92)$; dimensões de célula unitária: $a 10.343(2)\text{Å}$ $b 10.343(2)\text{Å}$ $c 45.521(6)\text{Å}$, $\alpha 90^\circ$ $\beta 90^\circ$ $\gamma 90^\circ$ e $a 10.372(1)\text{Å}$ $b 10.372(1)\text{Å}$ $c 45.546(7)\text{Å}$, $\alpha 90^\circ$ $\beta 90^\circ$ $\gamma 90^\circ$) e uma na forma de sal (número de depósito: 1151162; grupo espacial: $P 1 (1)$; dimensão de célula unitária: $a 8.4435(6)\text{Å}$ $b 10.6655(7)\text{Å}$ $c 19.199(1)\text{Å}$, $\alpha 92.251(5)^\circ$ $\beta 98.869(5)^\circ$ $\gamma 92.881(5)^\circ$) (CCDC, 2024) (Chan; Gonda, 1990).

A DS neste trabalho foi obtida pela técnica de evaporação do solvente, utilizando metanol, para testar a obtenção de DS contendo MTX no estado amorfo, conforme o resultado obtido por Chan e Gonda, em que solubilizou MTX nesse solvente, obtendo o fármaco no estado amorfo (Chan; Gonda, 1990).

Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver e analisar se DS de MTX provoca aumento na solubilidade do fármaco em meio fisiológico, para possível aumento da sua biodisponibilidade e, consequentemente, administrar doses menores, diminuir os efeitos tóxicos e aumentar o tempo de uso e a possibilidade de novos esquemas terapêuticos. Para isso, foram desenvolvidas DSs de MTX por meio da metodologia de evaporação do solvente e como prova de conceito, foi avaliada a solubilidade das DSs em meio fisiológico relevante.

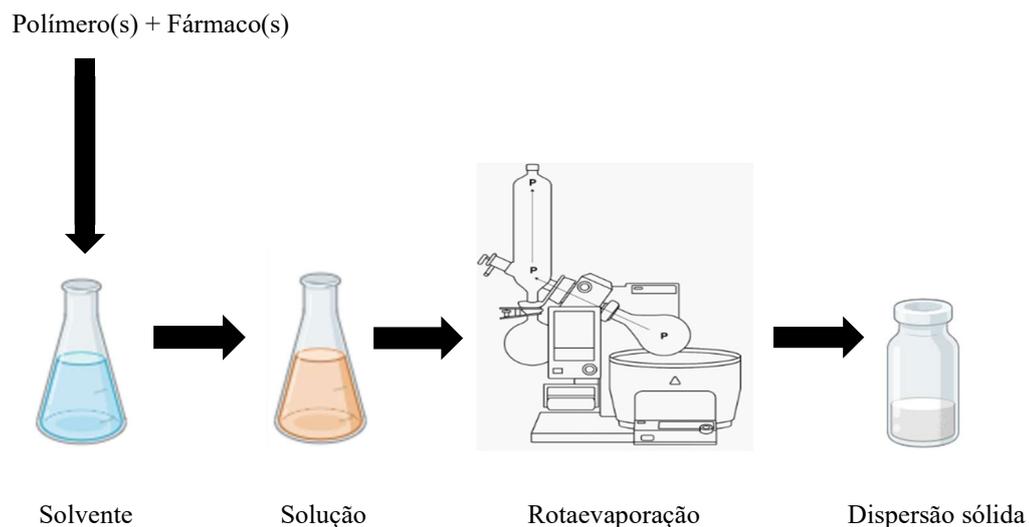
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dispersão sólida (DS)

A DS é uma estratégia farmacêutica, descrita primeiramente por Sekiguchi e Obi em 1961, usada para facilitar a dissolução e absorção de fármacos pouco solúveis em meio aquoso quando administrados por via oral (Gurunath *et al.*, 2013).

Essa técnica de dispersão de um ou mais fármacos em uma matriz transportadora sólida e inerte, esquematizada na Figura 1, proporciona um aumento da área de superfície, levando a uma redução do tamanho das partículas e melhoria na molhabilidade e porosidade. Todas essas vantagens físico-químicas favorecem a taxa de dissolução e a solubilidade do fármaco (Guntaka, 2019; Gurunath *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2019).

Figura 1 - Esquema de preparo de dispersão sólida pela técnica de evaporação do solvente.



Fonte: Biorender, 2024; Buchi, 2024; adaptado pelo autor (2024).

Por definição, a DS é um grupo de produtos sólidos composto por pelo menos dois componentes diferentes, que são o fármaco e a matriz hidrofílica. Esse fármaco pode estar em forma de partículas cristalinas ou no estado amorfo. Mas, o estado amorfo apresenta maior solubilidade em comparação a forma cristalina (Punitha *et al.*, 2011; Teja *et al.*, 2014). A técnica de preparo das dispersões sólidas também pode agregar a vantagem de transformar fármacos cristalinos no estado amorfo, contribuindo para o aumento da solubilidade (Guntaka; Lankalapalli, 2019).

As DSs podem ser classificadas de acordo com o arranjo molecular. Conforme essa classificação, as DSs são classificadas em dois tipos: misturas eutéticas, que são misturas preparadas por resfriamento rápido da fusão entre os dois componentes, com o objetivo de obter

uma mistura física de cristais muito finos, e as soluções sólidas. Estas soluções, conforme a miscibilidade, são de dois tipos: as soluções sólidas contínuas, em que os componentes são miscíveis independente das proporções, ou seja, as ligações intermoleculares são mais fortes do que as ligações intramoleculares e as soluções sólidas descontínuas, cuja a natureza química dos componentes limita a solubilidade entre eles (Sharma *et al.*, 2019).

As DSs podem também ser classificadas de acordo com os avanços recentes. Conforme essa classificação, as DSs são classificadas em três tipos: DS de primeira geração, que são DSs preparadas com carreadores no estado cristalino. A ureia e os açúcares são considerados como os primeiros transportadores cristalinos aplicados nestes sistemas, DS de segunda geração, que são DSs em que consiste empregar carreadores amorfos no lugar dos carreadores cristalinos em suas preparações, ou seja, o fármaco fica disperso quimicamente no carreador polimérico, que são classificados como sintético, que são o povidona, polimetacrilatos de polietileno e glicóis e os naturais, que são o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), celulose e derivados de amido como a ciclodextrina, e DS de terceira geração, que são DSs que possui um carreador surfactante ou carreadores formados por uma mistura de polímeros amorfos e surfactantes, que possibilitam maior biodisponibilidade para fármacos com baixa solubilidade, utilizando geralmente tensoativos como inulina e poloxâmero 407 (P407). O aumento da biodisponibilidade provocado pelos carreadores sofre influência do tipo de tensoativo e não de sua concentração, conforme estudo realizado por Bolourchian e Panah (Bolourchian; Panah, 2022; Sharma *et al.*, 2019).

As DSs possibilitam o encontro de diferentes estruturas moleculares na matriz carreadora. Por isso é importante aplicar diferentes métodos com objetivo de detectar a quantidade de partículas cristalinas existentes na dispersão e indiretamente descobrir a quantidade de fármaco amorfo ou disperso molecularmente na preparação. DSs podem ser caracterizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios x, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, estudos de solubilidade e dissolução *in vitro* e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jahnavi *et al.*, 2020).

2.1.1 Estabilidade física de dispersão sólida

O emprego da tecnologia farmacêutica na obtenção de DSs tem sido bem-sucedido, mas a estabilidade física, que é considerado o principal dificultador de seu desenvolvimento, permanece sendo um grande desafio para os cientistas da área de desenvolvimento de formulação farmacêutica. Vários fatores, como a temperatura de transição vítrea (T_g) de fármacos e de polímeros amorfos, mobilidade molecular de fármacos, miscibilidade fármaco-polímero, solubilidade de fármaco nos polímeros, estabilidade física de fármacos amorfos

sozinhos, interação fármaco-polímero, peso molecular dos fármacos, temperatura de recristalização de fármacos amorfos, ambiente de armazenamento (temperatura e umidade) e processo de preparo, podem prejudicar a estabilidade física das DSs. Esses fatores são classificados em termodinâmicos e cinéticos. Os fatores termodinâmicos estão relacionados com a estabilidade termodinâmica de DS, que pode definir a espontaneidade de acontecer uma instabilidade física, como a separação de fases ou a recristalização. Os fatores cinéticos estão relacionados com a estabilidade cinética, que pode ser utilizada para calcular ou descrever a taxa de separação de fase ou de recristalização de DS e, portanto, compreender esses fatores é importante para prever a vida útil de medicamentos preparados por DS (Lin *et al.*, 2018).

Os fatores ambientais, temperatura e umidade, afetam indiretamente a estabilidade física de DS por meio dos fatores termodinâmicos e cinéticos. Portanto, o aumento da temperatura pode provocar aumento da mobilidade molecular, fazendo com que aumente substancialmente a taxa acelerada de separação de fases e de recristalização de DS. Já a umidade pode provocar efeito plastificante e destruição das ligações de hidrogênio intermoleculares existentes entre o fármaco e o polímero (Lin *et al.*, 2018).

A estabilidade física das DSs também possui uma grande dependência da solubilidade do fármaco no excipiente e a sua temperatura de transição vítrea (Tg). Formulações com quantidade de fármaco menor que a sua solubilidade no excipiente se apresenta termodinamicamente estável. Em relação a Tg, existem estratégias como o armazenamento de DS amorfa em temperatura abaixo da sua Tg e o uso de carreadores poliméricos com Tg altas para contornar a dependência desse fator (Lehmkemper *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018).

As interações fármaco-polímero, como as ligações de hidrogênio e as interações ácido-base, provocam estabilidade física por reduzir a mobilidade molecular dos fármacos nas DSs. Porém, a interação ácido-base depende das propriedades químicas do fármaco e dos polímeros e as ligações de hidrogênio formadas entre os polímeros hidrofílicos, como a polivinilpirrolidona (PVP) e a copovidona (PVPVA 64) e o fármaco podem deixar de existir caso estiverem em um meio com alta umidade, levando assim a separação de fases, a recristalização e conseqüentemente a perda da estabilidade física (Lin *et al.*, 2018).

2.1.2 Técnicas de preparação de dispersão sólida por evaporação do solvente

Metodologia realizada em duas etapas: a primeira consiste em dissolver o fármaco e a matriz transportadora em um solvente volátil. Esse solvente deve dissolver os dois componentes e possuir menor ponto de ebulição. E em geral são usados solventes orgânicos como etanol, acetona, álcool isopropílico e diclorometano para preparar a solução. A segunda etapa envolve a evaporação do solvente, levando a formação da DS, que é posteriormente triturada, tamisada

e seca. Essa secagem pode ser realizada em dessecador a vácuo, removendo completamente o solvente residual (Guntaka; Lankalapalli, 2019; Gurunath *et al.*, 2013; Jahnavi *et al.*, 2020; Malkawi *et al.*, 2022; Mir, 2017; Nikam; Shete; Nikghalb *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2019).

Para escalonamento, técnicas como spray-drying podem ser adequadas pela alta produtividade, possibilidade de aplicação a fármacos sensíveis ao calor e obtenção de partículas com propriedades físico-químicas e morfológicas desejadas. Porém, para a fase de desenvolvimento pode ser inviável, devido a necessidade de grandes volumes de fármacos, solventes e excipientes (E *et al.*, 2021; Santos, 2017).

Para etapas iniciais de desenvolvimento e prototipagem em bancada, há métodos laboratoriais como rotaevaporador, estufa de ar quente a 40°C, dessecador, aquecimento por banho-maria a 50°C, temperatura ambiente de 25°C a 30°C por 24 horas e secagem a 75°C para evaporar solvente e preparar DS (Ismail, 2018; Lapuk *et al.*, 2019; Minhaz, 2012).

A técnica de evaporação apresenta riscos como a toxicidade do solvente, risco de acontecer separação de fases entre o fármaco e o carreador durante a remoção do solvente, dificuldade de encontrar solvente para dissolver o fármaco e a matriz transportadora com grandes diferenças de polaridade. Porém sua vantagem está na possibilidade de emprego de baixas temperaturas na evaporação do solvente, fácil execução e acessibilidade (Gurunath,2013; Malkawi,2022; Nikam,2020).

2.1.3 Panorama do mercado de dispersão sólida

Dispersão sólida é atualmente uma das metodologias mais eficientes para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (Tran *et al.*, 2019).

Mesmo apresentando fatores limitantes em relação à preparação, estabilidade e armazenamento, a quantidade de medicamentos preparados com essa tecnologia farmacêutica vem aumentando constantemente no mercado farmacêutico. Os medicamentos disponíveis são baseados em diferentes técnicas de preparação e no aprimoramento dos excipientes (Nair *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2019). Existem vários produtos farmacêuticos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) preparados por meio da tecnologia de DS e estão ilustrados na Tabela 1 (Bhujbal *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Produtos farmacêuticos aprovados pelo FDA baseados na tecnologia de dispersão sólida. (continua)

Produto	Fármaco	Empresa
Cesamet®	nabilona	Meda Pharmaceuticals
Isoptin® SR	verapamil	Laboratórios Ranbaxy
Sporanox®	itraconazol	Janssen
Prograf®	tacrolimo	Astellas Pharma
NuvaRing®	etonogestrel/etinilestradiol	Merck
Kaletra	lopinavir/ritonavir	AbbVie
Intelence®	etravirina	Janssen
Modigraf®	tacrolimo	Astellas Pharma
Zortress®	everolimo	Novartis
Norvir®	ritonavir	AbbVie
Onmel®	itraconazol	Merz Pharma
Incivek®	telaprevir	Vértice
Zelboraf®	vemurafenibe	Roche
Kalydeco®	ivacaftor	Vértice
Noxafil®	posaconazol	Merck
Astagraf XL®	tacrolimo	Astellas Pharma
Belsomra®	suvorexant	Merck
Harvoni®	ledipasvir/sofosbuvir	Gilead Ciências
Viekira XR™	dasabuvir/ombitasvir/ paritaprevir/ritonavir	AbbVie
Epclusa®	sofosbuvir/velpatasvir	Gilead Ciências
Orkambi®	lumacaftor/ivacaftor	Vértice
Venclexta®	venetoclax	AbbVie
Zepatier®	elbasvir/grazoprevir	Merck
Stivarga®	regorafenibe	Bayer
Mavyret™	glecaprevir/pibrentasvir	AbbVie

Tabela 1 - Produtos farmacêuticos aprovados pelo FDA baseados na tecnologia de dispersão sólida.

Produto	Fármaco	Empresa
Lynparza®	olaparibe	Astra Zeneca
Orilissa®	elagolix	AbbVie
Erleada®	apalutamida	Janssen
Trikafta®	elexacaftor (cristalino)/ ivacaftor/tezacaftor	Vértice
Symdeko®	tezacaftor/ivacaftor e ivacaftor	Vértice
Braftovi®	encorafenibe	Pfizer
Oriahnn™	elagolix/estradiol/acetato noretindrona	de AbbVie

Fonte: Bhujbal *et al.*, 2021.

2.1.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental ou design de experimentos (DoE) é considerado a principal ferramenta estatística para aplicar o Quality by Design em setores industriais e científicos. Embora o seu uso inicial foi no setor agrícola, as indústrias químicas passaram a adotar essa ferramenta a partir da década de 1950. Portanto, o DoE é o principal procedimento sistemático que exige a aplicação estatística no ponto de partida para o desenvolvimento de uma formulação (Politis *et al.*, 2017).

O DoE é um procedimento em que provoca variação dos fatores de entrada controlados para avaliar os seus efeitos nas respostas. As estratégias de design experimental apresentam vantagens como a potencialização do conhecimento do processo usando poucos recursos, a possibilidade de obtenção de informações precisas com mais eficiência, a identificação de interações fatoriais, a caracterização de cada fator com a sua significância relativa, a previsão comportamental do processo no espaço de design e a proteção do produto ou processo contra influência externas e não controláveis (Politis *et al.*, 2017).

Para elaborar o DoE precisa desenvolver sete fases que são as seguintes: definir os objetivos por meio do Quality Target Product Profile (QTPP), selecionar as variáveis do processo (fatores) e respostas, selecionar um projeto experimental de acordo com os objetivos do DoE, triagem, caracterização ou otimização do processo e formulação, executar a matriz do projeto com a identificação dos parâmetros não incluídos, verificar a consistência entre os dados

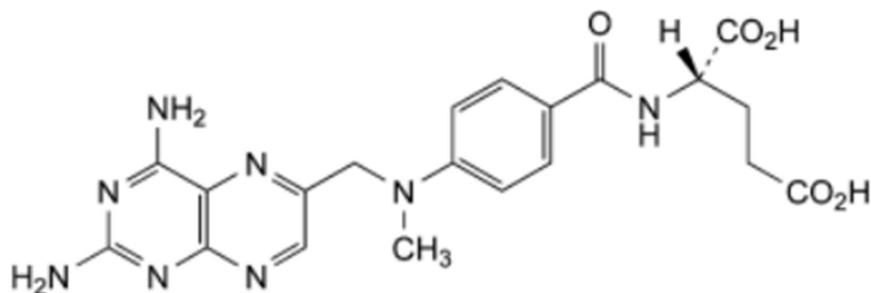
e as suposições experimentais, usar ANOVA e ferramentas gráficas para analisar os resultados e interpretar os resultados (Politis *et al.*, 2017).

Existem três tipos de desenho experimental: os projetos de mistura, que são empregados quando existe a definição da quantidade total de uma composição, os experimentos fatoriais ou de processo, cujo emprego faz com que os parâmetros do processo sejam variados simultâneos e intencionalmente conforme a matriz pré-definida de combinações de fatores, e os projetos de processo de mistura, que são empregados quando existe a necessidade de estudar as interações entre a formulação e as variáveis do processo (Politis *et al.*, 2017).

2.1.5 Metotrexato

O fármaco MTX, cujo nome químico é (2s)-2-[[[(2,4-diamino-6-pteridínil) metil] metilamina] benzoil] amina] ácido pentanoico (MM= 454,4 g/mol, Figura 2), apresenta quimicamente como um pó cristalino, com cor amarela ou laranja, higroscópico, possui faixa de fusão de 193°C a 195°C, praticamente insolúvel em água, etanol 96% e cloreto de metileno, e pouco solúvel em ácido clorídrico diluído. Porém, é solúvel em soluções contendo hidróxidos alcalinos e carbonatos. Outras características químicas apresentadas pelo metotrexato são: a instabilidade química, ou seja, pode sofrer degradação sob ação da luz ou de faixa extrema de pH ou temperatura, e a presença de estereoisomerismo em sua molécula, devido a existência de um centro quiral, tendo o estereoisômero S como substância ativa. E sua pureza enantiomérica é analisada por HPLC (Anupam *et al.*, 2022; Chan *et al.*, 2015; Ema, 2016; Raj Giri *et al.*, 2021).

Figura 2 - Estrutura molecular do metotrexato.



Fonte: Ema, 2016.

O MTX é um fármaco considerado de primeira escolha para o tratamento da artrite reumatóide e é associado com outros fármacos como sulfassalazina, hidroxicloroquina e especialmente os biológicos DMARDs (Drogas Modificadoras de Doença Reumática) para aumentar a sua ação terapêutica. E também é indicada sua associação com fármacos anti-TNF para obter um melhor resultado terapêutico (Kozmiński *et al.*, 2020).

O fármaco MTX é indicado para o tratamento de quadros moderados de psoríase em placas grave, eritrodermia psoriásica, psoríase pustulosa generalizada, psoríase ungueal, psoríase palmoplantar e, principalmente, na artrite psoriática. Esse fármaco é uma excelente escolha terapêutica para o tratamento de psoríase que não responde a terapias tópicas como o uso de acitretina, ao uso de banda larga e banda estreita com psoralênicos UVA (PUVA) e UVB ou quando esses tratamentos não estão disponíveis ou não são aceitos pelo paciente. E também é indicado para pacientes que passaram por tratamentos biológicos antipsoriáticos ineficazes ou que sofreram efeito rebote (Carretero *et al.*, 2010).

O MTX pertence a classe farmacêutica dos antagonistas do folato, que são considerados um dos primeiros tratamentos antineoplásicos desenvolvidos. Esse fármaco é indicado para neoplasias hematológicas, tumores cerebrais, câncer gástrico, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de bexiga e próstata, hepatoma, linfomas, certos tipos de carcinomas de cabeça, pescoço e esôfago-gástrico, osteossarcoma sem metástase ou após cirurgia de tumor primário ou neoplasia trofoblástica gestacional (Kozmiński *et al.*, 2020).

A administração oral de MTX em doses pequenas facilita a sua absorção, ao contrário do uso de altas doses que provoca absorção incompleta devido a saturação do mecanismo de transporte. A inativação do fármaco ocorre parcialmente no intestino e fígado, causando uma baixa biodisponibilidade. O MTX quando administrado por via oral e intramuscular atingiram, respectivamente, os níveis plasmáticos em 1 a 2h e 30 a 60 min. A posologia do MTX requer administração de doses repetidas para manter os seus níveis plasmáticos dentro da faixa terapêutica, devido o seu tempo de meia-vida ser muito curto (1,5-3,5h), podendo causar efeitos tóxicos. Os efeitos tóxicos do MTX administrado por via oral é dose-dependente, sendo assim, a maior eficácia ocorre com a administração de doses iniciais de 20 mg. Porém, a via parenteral demonstra maior efetividade com menos reações adversas gastrointestinais. Devido a essa possibilidade de ocorrer efeitos tóxicos ao administrar MTX, é necessário que faça o monitoramento de paciente por meio da checagem de hemograma e das funções renal, em que o pH urinário deve estar maior ou igual a 7,5 e o fluxo urinário seja maior ou igual a 200 mL.h⁻¹, e hepática. O parâmetro farmacocinético de eliminação apresenta um tempo de meia-vida de, aproximadamente, 3 a 10h para pacientes com psoríase ou artrite reumatoide tratados com

MTX, tendo o 7-hidroxi-metotrexato e o 4-amino-4-deoxi-N10-ácido metilpteroico como os seus principais metabólitos. Esse fármaco é excretado por via renal (90%) e via gastrointestinal (10%), tendo a sua eliminação praticamente na forma inalterada pela urina por meio dos mecanismos de filtração e secreção ativa (Barbosa, 2012; Oliveira, 2013; Pinto, 2012; HSL, 2017).

Existem fatores limitantes que dificultam a administração do MTX. Entre eles estão a baixa solubilidade e o coeficiente de partição negativo ($\text{Log } P = -1,85$), cujo valor faz com que o fármaco seja considerado de baixa permeabilidade, sendo assim, classificado como classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS). O MTX apresenta uma dissolução reduzida e uma absorção demorada pelo trato gastrointestinal, levando a uma baixa biodisponibilidade oral e a efeito terapêutico baixo, com grandes variações nas concentrações plasmáticas dos pacientes. Essas características são desafiadoras em relação ao desenvolvimento de formulações administradas por via oral. Além disso, possui toxicidade dose dependente, sendo causador de vários efeitos adversos como a mielossupressão grave, supressão da medula óssea, fibrose hepática, hepatite, cirrose, disfunção renal, hiperglicemia e ganho de peso (Hamed *et al.*, 2022; Pubchem, 2004; Raj Giri *et al.*, 2021).

O MTX possui uma solubilidade aquosa pH dependente, por existirem duas carboxilas, com valores de pKa de 4,8 e 5,5, em sua estrutura molecular. Esse tipo de estrutura molecular faz com que o MTX apresente uma maior solubilidade em soluções alcalinas, por estar na forma ionizada, do que em soluções ácidas, onde o fármaco se encontra na forma não ionizada e pouco solúvel (Barbosa, 2012; Cavalcante, 2023).

Estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade do MTX podem ser encontradas e a maioria foca no desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estratégias exploradas para aumentar a solubilidade do MTX e citadas na Literatura.

Sistema	Técnica de preparação	Resultado	Referência
Complexo de inclusão binária	Spray - drying	Melhoria significativa da solubilidade por complexo MTX/DM - β - CD	Giri et al., 2022
Dispersão sólida ligada à superfície (SASD)	Spray - drying	SASD ternária MTX/Na CMC/ SLS aumentou 31,78 vezes a solubilidade em comparação ao fármaco livre	Raj Giri et al., 2021
Nanodispersão sólida	Evaporação	Melhoria da solubilidade	Rajalingam et al., 2020
Dispersão sólida	Fusão	Aumento da solubilidade em 20 vezes em pH = 6,8 com DS P407 em comparação ao fármaco livre	Agafonov; Ivanov; Terekhova, 2021
Líquido iônico (IL)	Neutralização	Aumento da solubilidade com IL [ProEt] [MTX]	Moshikur et al., 2021
Microemulsão	Spray - drying	Aumento significativo da solubilidade com microemulsão sólida	Kim et al., 2019
Conjugação	Esterificação	Melhoria da solubilidade em meio ácido	Yousefi et al., 2010
Nanossuspensão	Liofilização	Aumento da solubilidade em 8,31 vezes em comparação ao fármaco livre	Powar et al., 2021
Dispersão sólida	Evaporação	Aumento da solubilidade à medida que aumentou a concentração de polímero	Madhi et al., 2023

Fonte: Do autor (2024).

Em relação ao estado da arte, a inovação desta proposta é focar na amorfização do MTX para o aumento da solubilidade, sendo novidade e vantagem em relação às estratégias anteriormente usadas (Rolim-Neto *et al.*, 2015).

De acordo com Chan e Gonda (1990), existem quatro variações do estado sólido do MTX, incluindo a amorfa, que pode ser mais solúvel que a forma hidrato e tetragonal. Os autores obtiveram essa forma pela solubilização e secagem do fármaco em metanol. A DS neste trabalho foi obtida pela técnica de evaporação do solvente, utilizando metanol, para testar a obtenção de DS contendo MTX no estado amorfo (Chan; Gonda, 1990).

Várias pesquisas são realizadas usando a metodologia de DS, como as dos grupos de Raj Giri e colaboradores (2021), Mahdi e colaboradores (2023), Agafonov e colaboradores (2021), para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade do metotrexato. Esses grupos usaram, respectivamente, as técnicas de spray-drying, evaporação e fusão para preparação de DS. Os resultados obtidos por essas pesquisas foram o aumento da solubilidade do fármaco MTX em 11 vezes em uma proporção fármaco-polímero de 1:4 e 2,8 vezes ao usar em formulação contendo a mistura fármaco-polímero-surfactante e se observou influência do pH na solubilidade do MTX, sendo maior em pH ácido (Agafonov, 2021; Mahdi *et al.*, 2023; Raj Giri *et al.*, 2021).

Este trabalho explora a técnica de evaporação do solvente por ser mais acessível e adequada para escala laboratorial de uma primeira fase mais exploratória. Essa técnica é mais fácil e não requer equipamentos tão específicos como spray - drying e Hot Melt Extruder. E possui também a vantagem em relação a métodos que empregam a fusão por proporcionar a manutenção da estabilidade térmica do fármaco durante a produção. Além disso, a técnica da evaporação do solvente permite explorar especificamente os achados de Chan e Gonda (1990), que obteve o estado amorfo do MTX pela solubilização e secagem do fármaco em metanol, cujo o seu emprego é adequado para a técnica selecionada. A associação de polímeros adequados para obtenção de DSs juntamente com a possibilidade de amorfização do fármaco podem ser um diferencial e uma inovação deste trabalho.

2.1.6 Excipientes com maior aplicabilidade no desenvolvimento de dispersões sólidas

De maneira geral, os excipientes são escolhidos primeiramente pelo seu perfil de segurança e aprovações regulatórias anteriores devido ao bom desempenho durante estudos clínicos. Adicionalmente, para DS, o polímero deve possuir boa estabilidade térmica e reologia, para permitir escalonamento para técnicas como *Hot Melt Extrusion*, e/ou solubilidade suficiente para técnicas de evaporação do solvente (Adjei *et al.*, 2022).

Para dispersões sólidas amorfas em específico, o polímero deve apresentar propriedade que mantenha o fármaco no estado amorfo durante o processamento e o armazenamento, ser solúvel no ambiente gastrointestinal e promover a dissolução e permeação *in vivo*. Além disso, é importante que o polímero tenha baixa tendência de formar cristal, pois ele irá se associar ao fármaco amorfo para alterar a cinética de supersaturação da molécula. O polímero deve contribuir com o processo de manutenção do fármaco no estado amorfo e estabilizar a DS pela redução da mobilidade molecular e estendendo a Tg. O obstáculo estérico criado pelo aumento da área interfacial da estrutura da DS atua como inibidor da cristalização e previne a nucleação e o crescimento do cristal (Pandi *et al*, 2020).

Poucos polímeros possuem boa formação vítrea com baixa tendência à cristalização. Excipientes referenciados como adequados para a produção de DSs amorfas foram levantados a partir de trabalhos de revisão recentes (Pandi *et al*, 2020; Anane-Adjei *et al.*, 2022). Esses polímeros são relatados como seguros (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pelo FDA. Dentre eles estão os derivados de celulose como hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, polissacarídeos como quitosana, polímeros como polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30), polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), solubilizantes como dietilenoglicol monoetil éter (DGME) e tensoativos como poloxâmeros 188 (P188) e 407 (P407) (Anane-adjei *et al*, 2022; Pandi *et al*, 2020).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar DSs contendo o fármaco MTX para potencial aumento da sua solubilidade em meio fisiológico.

3.1 Objetivos específicos

Para verificar o potencial aumento da solubilidade do MTX foram realizados:

- a) obtenção de DS de MTX pela técnica de evaporação do solvente;
- b) realização de caracterização físico-química da DS por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial e difração de raios X para comprovar a formação do sólido amorfo;
- c) avaliação da solubilidade em meio fisiológico simulado como prova de conceito.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Metanol, Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, Brasil.

Metanol, Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, Brasil.

Metotrexato, Fagron, Anápolis, Brasil.

Poloxamer 407, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

Polietilenoglicol 6000, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil.

Polivinilpirrolidona, Inlab, São Paulo, Brasil.

4.2 Equipamentos

Agitador orbital de tubos, Cole Parmer TR - 200, Antylia Scientific Ltda, Stone, Reino Unido.

Analisador termogravimétrico TA Instruments SDT-Q600, TA Instruments, New Castle, USA.

Balança analítica, UniBloc AUY220, Shimadzu TM, Tóquio, Japão.

Centrífuga, Daiki, DTC - 16000, Changsha, China.

Centrivap concentrator, Modelo 7810014, Labconco Corporation, Kansas City, USA.

Centrivap gold traps, Modelo 7460020, Labconco Corporation, Kansas City, USA.

Calorímetro, DSC Syrius 3500, NETZSCH, Kanagawa, Japão.

Difratômetro, Ultima IV, Rigaku, Tóquio, Japão.

Espectrofotômetro, Affinity, Shimadzu TM, Tóquio, Japão.

Incubadora orbital, WEG S.A., Jaraguá do Sul, Brasil; Novus Produtos Eletrônicos Ltda, Canoas, Brasil.

Rotaevaporador, Evaporador Rotativo Modelo 804, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil.

Rotaevaporador, Rotavapor R - 100, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça.

4.3 Métodos

4.3.1 Validação de método analítico para quantificação de MTX por espectrofotometria UV

Um método foi desenvolvido e validado de acordo com os parâmetros estipulados pela RDC 166 de 2017 da ANVISA e o guia ICH Q2(R2) (2022).

4.3.1.1 Determinação do espectro de absorção por espectrofotometria UV

A determinação do pico de absorção máximo do MTX foi realizada por meio de espectrofotometria UV, entre 200 e 400 nm, a partir de solução metanol do fármaco a 10 µg.mL⁻¹.

4.3.2 Seletividade

A determinação deste parâmetro foi realizada por meio de comparação com os espectros de absorção de amostra com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MTX e amostra com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de um dos seguintes excipientes em metanol: Poloxamer 407 (P407), Polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) ou Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000).

4.3.3 Linearidade

Este parâmetro foi determinado pela curva analítica do fármaco nas concentrações de 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em metanol, preparadas a partir de uma solução estoque (metanol e MTX) a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, preparadas em triplicatas e analisadas por espectrofotometria na região UV. Os valores de absorbâncias obtidos foram plotados no software R para realizar estudo estatístico. Os testes empregados para avaliar a linearidade foram: Cochran, Teste F e Shapiro – Wilk, com objetivo de avaliar a homogeneidade de variâncias, a adequação do modelo de regressão (avalia a significância do coeficiente angular) e a normalidade de resíduos, respectivamente. Foram plotados gráficos para visualização da distribuição dos resíduos em função da concentração e da concordância entre área experimental e área calculada a partir da reta obtida.

4.3.4 Exatidão

A exatidão da metodologia foi avaliada por meio do teste de adição de analito (MTX) na formulação e do cálculo de recuperação. Os valores obtidos devem ficar entre 97% e 103% (AOAC, 2016). Foram preparadas amostras contendo as DS em suspensão acrescidas de MTX em três níveis de concentração: 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 8,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O cálculo de recuperação foi realizado por meio da equação 1 (AOAC, 2016):

$$R (\%) = \frac{C_f - C_u}{C_a} \times 100 \quad (1)$$

Onde: R (%) é a recuperação, C_f é a concentração da amostra acrescida de analito, C_u é a concentração da amostra sem adição de analito e C_a é a concentração do analito adicionado à amostra.

4.3.5 Precisão

A determinação da precisão intradia foi realizada por meio da análise de 9 amostras, ou seja, três níveis nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata, no mesmo dia, tendo-se assim um número de amostras ensaiadas entre 6 e 15, conforme Inmetro (2016). Para avaliar este parâmetro, primeiramente, foram preparadas nove soluções estoque de MTX em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a partir delas foram preparadas soluções diluídas em metanol nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata, no mesmo dia.

A determinação da precisão intermediária foi feita por meio de 18 amostras, ou seja, três níveis nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata, em dois dias diferentes, tendo-se assim um número de amostras ensaiadas ≥ 15 , conforme Inmetro (2016). Para avaliar este parâmetro, primeiramente, foram preparadas nove soluções estoque de MTX em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a partir delas foram preparadas soluções diluídas em metanol nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicada, para cada dia de avaliação.

Para garantir se o método aplicado demonstra precisão, o desvio padrão relativo (DPR%) deve apresentar valores menores que 2,7% (AOAC, 2016).

O cálculo de desvio padrão relativo (DPR%) foi realizado por meio da equação 2 (AOAC, 2016):

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{DP}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: DPR (%) é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e \bar{x} é a média das absorvâncias de cada concentração.

4.3.6 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir de três curvas analíticas e calculados por meio das suas respectivas equações 3 e 4 (Brasil, Ministério da Saúde, 2017).

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{\text{DP}}{\text{IC}} \quad (3) \quad \text{LQ} = 10 \times \frac{\text{DP}}{\text{IC}} \quad (4)$$

Onde: LD é o limite de detecção, LQ é o limite de quantificação, DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação da curva de calibração.

4.3.7 Determinação da solubilidade do MTX em metanol

Foram preparadas, em triplicata, 1 ml de soluções de MTX em metanol a 10 mg.mL^{-1} com presença de corpo de fundo. As soluções foram acondicionadas em tubos plásticos de 1 ml, protegidos com papel alumínio para proteção contra luz e colocados no agitador orbital de tubos (Cole - Parmer TR - 200, Stone, Reino Unido) por 24h em temperatura ambiente. Após a agitação, os vials foram centrifugados (Daiki DTC - 16000, Changsha, China) por 10 minutos a 10.000 RPM. Coletou-se 50 μL de sobrenadante e diluiu em balão de 50 mL com metanol até o menisco e realizou a leitura de cada diluição por meio da técnica de espectrofotometria por UV. Para o cálculo da concentração solubilizada de MTX em metanol, utilizou-se a curva de calibração obtida.

4.3.8 Desenvolvimento da dispersão sólida

Primeiramente, preparou a solução de MTX em metanol a uma concentração solúvel sem a ocorrência de precipitação. As DSs foram preparadas com 1 mL da solução de MTX e diferentes proporções de DGME, P188, P407, PVP K-30 e PEG 6000, de acordo com a Tabela 3.

As amostras foram acondicionadas em vials de 1 mL, agitadas em vórtex por 2 min, envoltas de parafilme e papel alumínio para proteção contra luz. Em seguida, foram submetidas a agitação por 24h em agitador orbital de tubos Cole - Parmer TR -200, Antylia Scientific Ltda, Stone, Reino Unido.

Todas as amostras preparadas foram submetidas à secagem a vácuo em temperatura de 40°C por 60 minutos, utilizando o equipamento Centrivap concentrador, Kansas City, EUA, e armazenadas em dessecador. As amostras DSs U e V, selecionadas para caracterização e estudo de solubilidade, foram submetidas à secagem por 20 min em rotaevaporação sob temperatura de 47°C e rotação de 80 rpm, utilizando os equipamentos Evaporador Rotativo Modelo 804, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil e Rotavapor R - 100, BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça, e armazenadas em dessecador.

Os parâmetros de entrada no delineamento experimental foram o tipo de polímero e sua concentração, variando em três níveis. Os parâmetros de saída para seleção do protótipo foi o aspecto visual da homogeneidade da dispersão sólida, sem a constatação de separação de fases e que resulte em um sistema sólido.

Tabela 3 - Delineamento experimental para o preparo das dispersões sólidas de metotrexato (MTX), Poloxâmero 188 (P188), dietilenoglicol monoetil éter (DGME), poloxâmero 407 (P407), polivinilpirrolidona K30 (PVP K-30) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). O MTX foi incorporado a $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ em todas as amostras.

(continua)

Amostra	Níveis do delineamento experimental					Massa dos excipientes para 1 ml de solução de MTX em metanol				
	P188	DGME	P407	PVP K-30	PEG 6000	P188 (g)	DGME (g)	P407 (g)	PVP K-30 (g)	PEG 6000 (g)
A	-1	-1	-	-	-	0	0	-	-	-
B	-1	1	-	-	-	0	0,10	-	-	-
C	1	-1	-	-	-	0,10	0	-	-	-
D	1	1	-	-	-	0,10	0,10	-	-	-
E	0	-1	-	-	-	0,05	0	-	-	-
F	0	1	-	-	-	0,05	0,10	-	-	-
G	-1	0	-	-	-	0	0,05	-	-	-

Tabela 3 - Delineamento experimental para o preparo das dispersões sólidas de metotrexato (MTX), Poloxâmero 188 (P188), dietilenoglicol monoetil éter (DGME), poloxâmero 407 (P407), polivinilpirrolidona K30 (PVP K-30) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). O MTX foi incorporado a $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ em todas as amostras.

(continuação)

Amostra	Níveis do delineamento experimental					Massa dos excipientes para 1 ml de solução de MTX em metanol				
	P188	DGME	P407	PVP K-30	PEG 6000	P188 (g)	DGME (g)	P407 (g)	PVP K-30 (g)	PEG 6000 (g)
H	1	0	-	-	-	0,10	0,05	-	-	-
I	0	0	-	-	-	0,05	0,05	-	-	-
J	-	-	-1	-1	-	-	-	0	0	-
K	-	-	-1	1	-	-	-	0	0,010	-
L	-	-	1	-1	-	-	-	0,010	0	-
M	-	-	1	1	-	-	-	0,010	0,010	-
N	-	-	0	-1	-	-	-	0,025	0	-

Tabela 3 - Delineamento experimental para o preparo das dispersões sólidas de metotrexato (MTX), Poloxâmero 188 (P188), dietilenoglicol monoetil éter (DGME), poloxâmero 407 (P407), polivinilpirrolidona K30 (PVP K-30) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). O MTX foi incorporado a $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ em todas as amostras.

(continuação)

Amostra	Níveis do delineamento experimental					Massa dos excipientes para 1 ml de solução de MTX em metanol				
	P188	DGME	P407	PVP K-30	PEG 6000	P188 (g)	DGME (g)	P407 (g)	PVP K-30 (g)	PEG 6000 (g)
O	-	-	0	1	-	-	-	0,025	0,010	-
P	-	-	-1	0	-	-	-	0	0,025	-
Q	-	-	1	0	-	-	-	0,010	0,025	-
R	-	-	0	0	-	-	-	0,025	0,025	-
S	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0,010
T	-	-	-	-	-1	-	-	-	-	0,025

Tabela 3 - Delineamento experimental para o preparo das dispersões sólidas de metotrexato (MTX), Poloxâmero 188 (P188), dietilenoglicol monoetil éter (DGME), poloxâmero 407 (P407), polivinilpirrolidona K30 (PVP K-30) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). O MTX foi incorporado a $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ em todas as amostras.

(conclusão)

Amostra	Níveis do delineamento experimental					Massa dos excipientes para 1 ml de solução de MTX em metanol				
	P188	DGME	P407	PVP K-30	PEG 6000	P188 (g)	DGME (g)	P470 (g)	PVP K-30 (g)	PEG 6000 (g)
U	-	-	1	-1	1	-	-	0,01	0	0,01
V	-	-	-1	1	1	-	-	0	0,01	0,01

Fonte: Do autor (2023)

4.3.9 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Avaliações de possíveis interações entre o polímero e o fármaco existente nas amostras foram realizadas por meio de um espectrofotômetro Affinity, Shimadzu TM, Tóquio, Japão, no infravermelho com transformada de Fourier na região espectral de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4,0 cm^{-1} e 34 scans e com o emprego de pastilhas de KBr.

4.3.10 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por DSC foi realizada por um calorímetro exploratório diferencial DSC Syrius 3500, NETZSCH, Kanagawa, Japão, conforme as recomendações do fabricante do equipamento.

Para as análises, as amostras U e V, as misturas físicas fármaco - polímeros (MFs) U e V, MTX livre, MTX tratado com metanol (MTX-MeOH) e os polímeros foram transferidos para cadinho de alumínio com tampa e posteriormente foi realizado o estudo. As condições de análise usadas foram as seguintes: taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, faixa de temperatura de 25°C a 250°C e atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$ (Pedreiro, 2012).

4.3.11 Difractometria de raios x

A análise por difratometria foi realizada por um difratômetro de raios x Ultima IV, Rigaku, Tóquio, Japão, em temperatura ambiente (25°C). Nesse estudo foram analisadas as amostras U e V, as MFs U e V, MTX, MTX - MeOH e os polímeros por meio de varredura de raios x de 3° a $35^{\circ} 2\theta$, usando uma fonte de radiação de $K\alpha\bar{C}u$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, passo ótico de $0,02^{\circ}$ e velocidade do goniômetro de $1^{\circ}2\theta.\text{min}^{-1}$ (Pedreiro, 2012).

4.3.12 Estudo de solubilidade

Foram adicionados 2 mL de solução tampão fosfato pH = 6,8, em triplicata, nas amostras de DS U e V, MF U e V, MTX tratado com metanol e MTX, contendo 0,014 g de fármaco, que foram colocadas em pequenos frascos. Essas preparações foram colocadas em uma incubadora orbital, WEG S.A., Jaraguá do Sul, Brasil; Novus Produtos Eletrônicos Ltda, Canoas, Brasil, sob temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e rotação de 150 rpm. Após observar a saturação e a presença de corpo de fundo durante todo o teste e ter transcorrido o tempo de 60 min, o volume de cada replicata foi filtrado com filtro hidrofílico de PTFE ($45 \mu\text{m}$). As amostras coletadas após 60 min foram adequadamente diluídas em metanol para que a concentração de MTX ficasse no intervalo de linearidade. Logo após, foram quantificadas por espectrofotometria no UV pelo método analítico previamente validado.

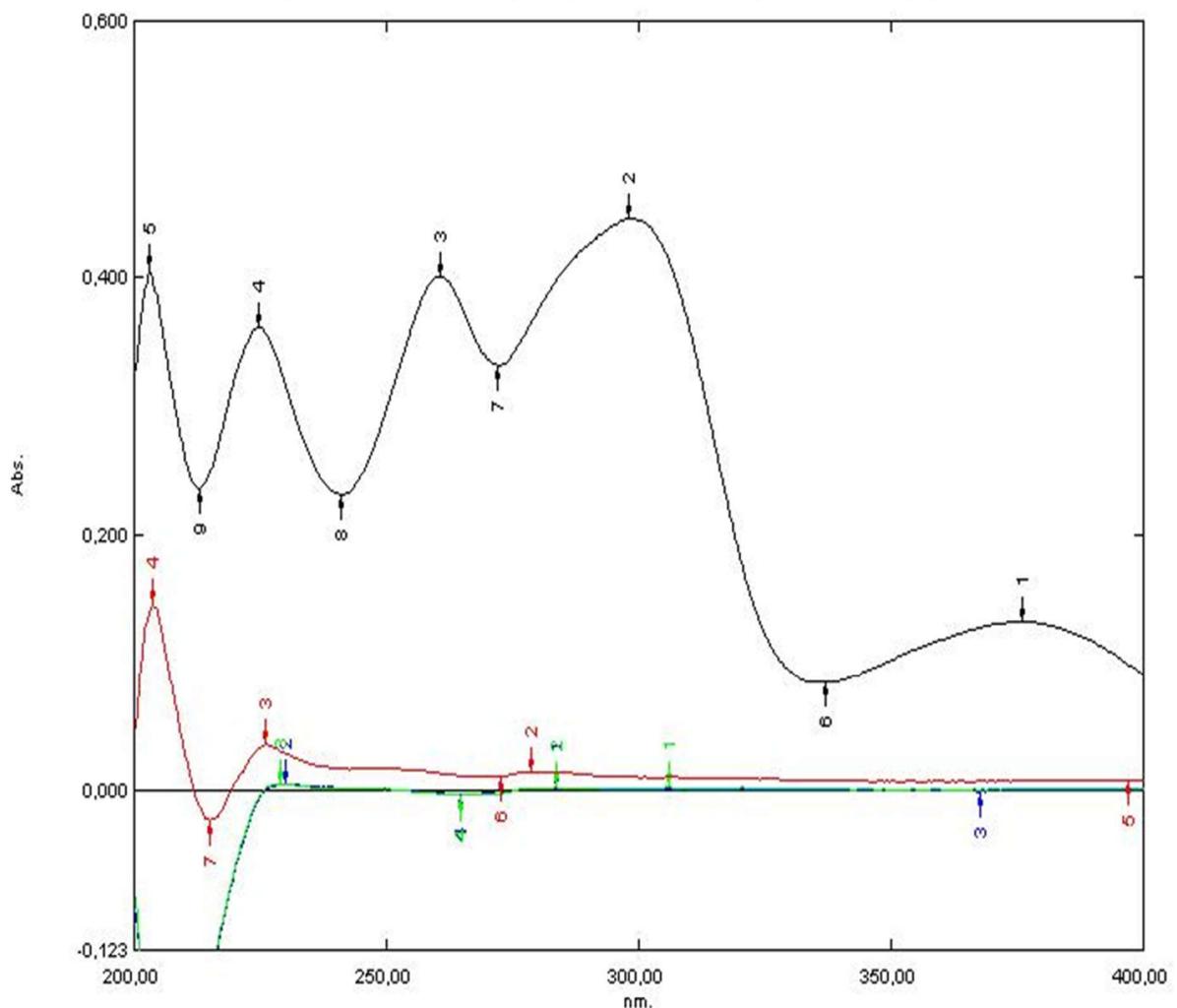
A análise estatística dos dados obtidos no estudo de solubilidade foi realizada com o emprego do software R aplicando-se ANOVA e posteriormente o Teste de Tukey para os dados paramétricos e análise de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, tendo a normalidade de distribuição dos resíduos e a homogeneidade de variância antes verificadas por teste de Shapiro-Wilk e teste de Bartlett, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Seletividade

A Figura 3 mostra o espectro de absorção na região UV da amostra do fármaco ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e das amostras dos polímeros (P407, PVP K-30 e PEG 6000) a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, na faixa compreendida entre 200 a 400 nm, observando que o pico máximo de absorção do fármaco MTX ocorreu em 298 nm, sendo o comprimento de onda de escolha para seletividade em relação aos polímeros, por apresentar absorção máxima de 0,446 e os polímeros PVP K-30, P407 e PEG 6000 apresentarem, respectivamente, absorção de 0,011, 0,001 e 0,002 nesse comprimento de onda.

Figura 3 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da amostra contendo MTX (preto), PVP K-30 (vermelho), P407 (azul) e PEG 6000 (verde) a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol.



Fonte: Do autor (2023).

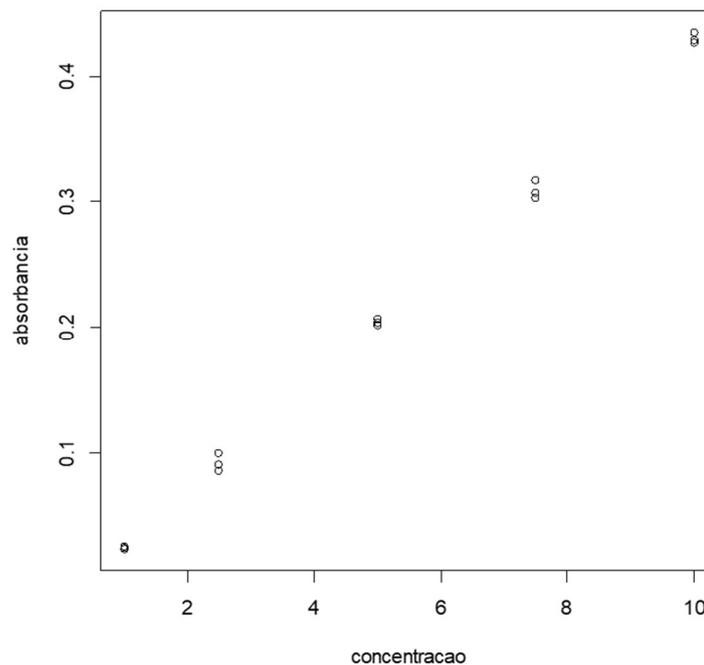
5.2 Linearidade

A metodologia espectrofotométrica demonstrou linearidade no comprimento de onda de 298 nm para as diluições do fármaco nas concentrações de 1, 2,5, 5, 7,5 e $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. O cálculo

do teste de Cochran revelou que o $C_{\text{calculado}}$ (0,445813) é menor que o C_{tabelado} (0,6838), demonstrando a ocorrência de uma distribuição homocedástica. Portanto, os dados foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, obtendo uma curva de calibração ajustada linearmente, com equação da reta: $y = 0,0446886X - 0,0201138$, $R^2 = 0,9986$ e $r = 0,9992$, demonstrando boa correlação entre as variáveis (Figura 4).

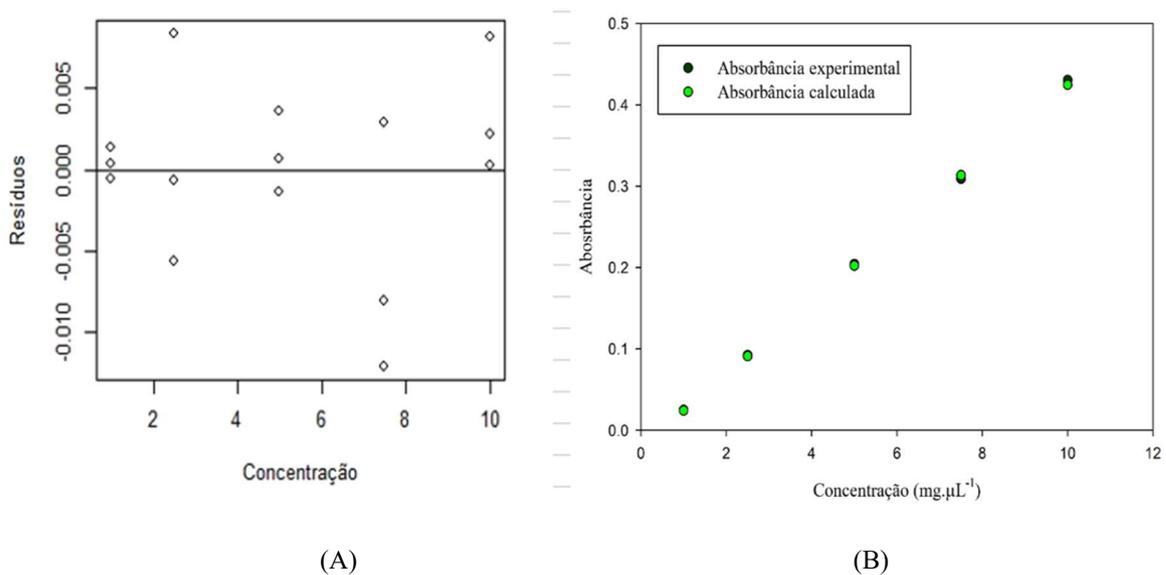
O teste F verificou que o coeficiente angular é significativo ($F_{\text{calculado}} = 1,008 \times 10^4$), tendo o valor de $p = 2,2 \times 10^{-16}$, demonstrando que o modelo de regressão adotado é adequado. A Figura 5A mostra a plotagem dos resíduos ao redor do eixo x. A soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear apresentou valor igual a 0,00041. O teste de Shapiro – Wilk ($W = 0,93336$; $p = 0,3061$) confirmou a normalidade da distribuição dos resíduos. Sendo assim, a plotagem simultânea da área experimental e da área calculada (Figura 5B) evidenciou que os valores calculados conforme a equação praticamente coincidem com os valores experimentais.

Figura 4 - Curva analítica do MTX em metanol, obtida por espectrofotometria a 298 nm.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 5 - Plotagem dos resíduos ao redor do eixo x (A) e plotagem simultânea da área experimental e da área calculada (B).



Fonte: Do autor (2023).

5.3 Exatidão

Os valores de recuperação obtidos das concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram, respectivamente, 101,44%, 97,41% e 97,84%. De acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), os resultados obtidos para recuperação ficaram entre o limite preconizado (AOAC,2016). Isso significa que a metodologia de quantificação por espectrofotometria proposta apresenta conformidade em relação a exatidão.

5.4 Precisão

A precisão é realizada com objetivo de avaliar a proximidade entre os resultados obtidos através de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (Brasil, 2017).

Os resultados obtidos para avaliar a precisão intradia e interdia estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Os valores de DPR foram menores que 2,7% para precisão intradia. Em relação a precisão interdia, os resultados obtidos da menor concentração não apresentaram DPR menor que 2,7% (AOAC, 2016). Embora não tenha apresentado precisão interdia para a menor concentração, o método analítico para quantificação de MTX por espectrofotometria UV é seletivo e exato, possui uma faixa de trabalho linear e apresenta precisão intradia e LD e LQ com conformidade. Portanto, o método pode ser perfeitamente aplicado para a quantificação de MTX, desde que seja construída uma curva de calibração a cada dia de análise.

Tabela 4 - Teste de precisão intradia, com os valores de concentração das amostras calculadas, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentrações calculadas			Média de Concentração (µg/mL)	DP	DPR (%)
	N1	N2	N3			
1	1,031	0,987	1,009	1,009	0,022	2,21
5	5,059	5,104	5,015	5,059	0,044	0,88
10	10,005	10,050	10,184	10,080	0,093	0,92

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 5 - Teste de precisão interdia ou intermediária, com os valores de concentração das amostras calculadas, média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

Concentrações teóricas (ug.mL ⁻¹)	Concentrações calculadas (ug.mL ⁻¹)						Média de concentração (µg.mL ⁻¹)	DP	DPR (%)
	Replicatas dia 1			Replicatas dia 2					
	n1	n2	n3	n1	n2	n3			
1	1,479	1,524	1,524	1,479	1,636	1,479	1,501	0,060	4,05
5	5,060	5,105	5,015	4,766	4,923	4,856	4,969	0,129	2,59
10	10,005	10,050	10,184	10,095	10,542	10,565	10,139	0,249	2,46

Fonte: Do autor (2023).

5.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Detecção corresponde à menor concentração do analito existente em uma amostra que pode ser detectada, mas, não obrigatoriamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito existente em uma amostra que pode ser medida com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2017).

Os resultados do desvio padrão do intercepto do eixo y para a curva de calibração obtida foi de 0,0018. Os valores dos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) obtidos por meio dos cálculos foram 0,12 e 0,39 µg.mL⁻¹, respectivamente.

5.6 Determinação da solubilidade do MTX em metanol

O valor médio de solubilidade do MTX em metanol obtido foi de 1,40 ± 0,96 mg.mL⁻¹ com DPR igual a 68,82. A partir desse resultado, para assegurar a solubilização do MTX na solução precursora da DS, ele foi incorporado a 0,7 mg.mL⁻¹.

5.7 Obtenção das dispersões sólidas

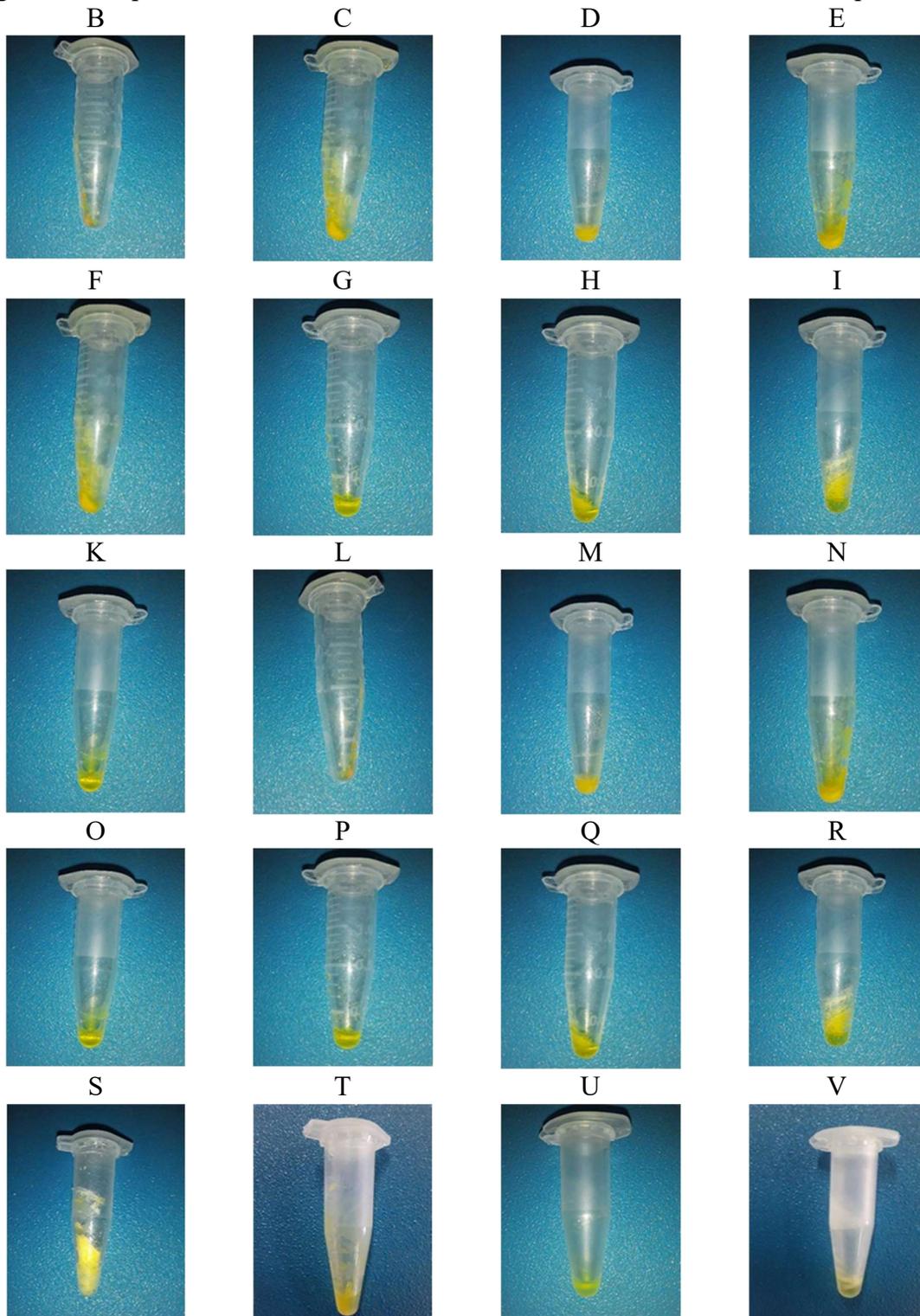
As amostras de DSs contendo DGME e/ou P188 resultaram em dispersões líquidas ao invés de sólidas (Figura 6). Este resultado pode ser devido à natureza do DGME ser líquido em temperatura ambiente e o P188 tender a formar gel.

Já para as amostras de DSs contendo, P407 e/ou PVP K-30, verificou que todas as DS obtidas após a secagem apresentaram aspecto sólido gelificado. As amostras M, N, R, P e Q apresentaram separação de fases, já as amostras K e L resultaram em DSs homogêneas (Figura 6).

Em relação às amostras contendo PEG 6000, a amostra “S” apresentou um aspecto sólido e a amostra “T” apresentou aspecto líquido. As amostras “U” e “V”, que contém PEG 6000 combinados com P407 ou PVP K-30, apresentaram aspecto sólido (Figura 6).

Os polímeros P407 e PVP K-30 não mostraram sinergia na formação de DS quando combinados, porém, resultaram em amostras sólidas quando utilizados isoladamente (amostras L e K), assim como o PEG 6000 (amostra S). As amostras contendo P407 ou PVP K-30 associados ao PEG 6000, por outro lado, resultaram em DS visualmente (amostras U e V, respectivamente). Portanto, esses protótipos foram os selecionados para a caracterização físico-química e estudo de solubilidade (Figura 6).

Figura 6 – Dispersões sólidas de DGME, P188, P407, PVP K-30 e PEG 6000 após a secagem.



Fonte: Do autor (2023).

Nota: DSs de B até I: contêm DGME e/ou P188; DSs K até R: contêm P407 e/ou PVP K-30; DSs S e T: contêm PEG 6000; DSs U e V: contêm P407 ou PVP K-30 e PEG 6000.

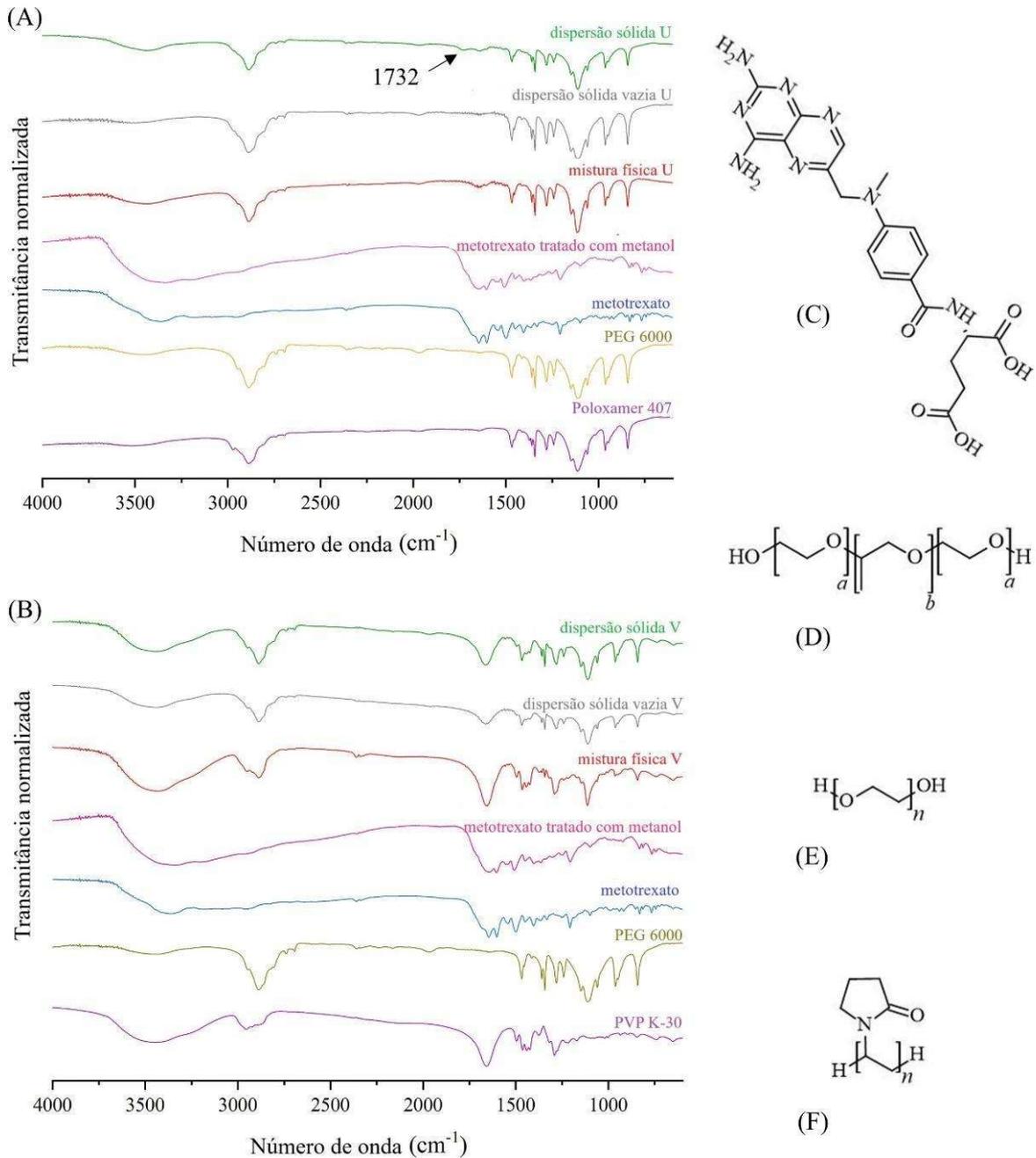
5.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 7 mostra os espectros de infravermelho das DSs U e V, com as correspondentes misturas físicas (MFs) do fármaco mais polímeros, das dispersões sólidas contendo somente

polímeros PEG 6000 e P407 ou PVP K-30 (DSs U e V vazias), do MTX livre, do MTX tratado com metanol (MTX-MeOH), e dos polímeros PEG 6000 e P407 livres.

Os estiramentos existentes nas dispersões sólidas U e V, nas misturas físicas correspondentes fármaco - polímeros, nas DSs U e V vazias, no MTX livre, no MTX tratado com metanol e nos polímeros P407, PEG 6000 e PVP K-30 estão na Tabela 6. Porém vale ressaltar que o espectro DS V apresentou pequenas mudanças em comparação com os excipientes e a sua MF correspondente: o estiramento da carbonila ocorre a 1661 cm^{-1} na DS V e a 1659 cm^{-1} no PVP K-30 e na MF V; o estiramento da hidroxila apresenta absorção máxima em 3450 cm^{-1} na DS V, 3444 cm^{-1} na MF V, e 3455 cm^{-1} em PVP K-30. Além disso, uma banda de absorção a 1732 cm^{-1} foi observada no espectro DS U, no entanto, notou-se a sua ausente tanto na DS U vazia quanto na MF U, indicando uma interação intermolecular em DS U, que não ocorre na DS U vazia e MF U. Esses achados de FTIR diferencia efetivamente a DS U da MF correspondente e dos excipientes.

Figura 7 – A e B: Espectros de infravermelho das DSs U e V, DSs U e V vazias, MFs U e V, MTXMeOH, MTX, PEG 6000, P407 e PVP K-30.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: Espectros de infravermelho: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 ou PVP K - 30 (dispersão sólida U ou V, em verde); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 ou PVP K - 30 (mistura física U ou V, em vermelho); dispersão sólida contendo somente polímeros PEG 6000 e P407 ou PVP K-30 (DS U ou V vazia, em cinza); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo). As estruturas químicas incluídas nas figuras são: metotrexato (C), Poloxâmero 407 (D), polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) (E) e polivinilpirrolidona K-30 (PVP K-30) (F).

Tabela 6 - Estiramentos existentes nas dispersões sólidas U e V, nas misturas físicas correspondentes fármaco - polímeros, nas DSs U e V vazias, no MTX livre, no MTX tratado com metanol e nos polímeros P407, PEG 6000 e PVP K-30.

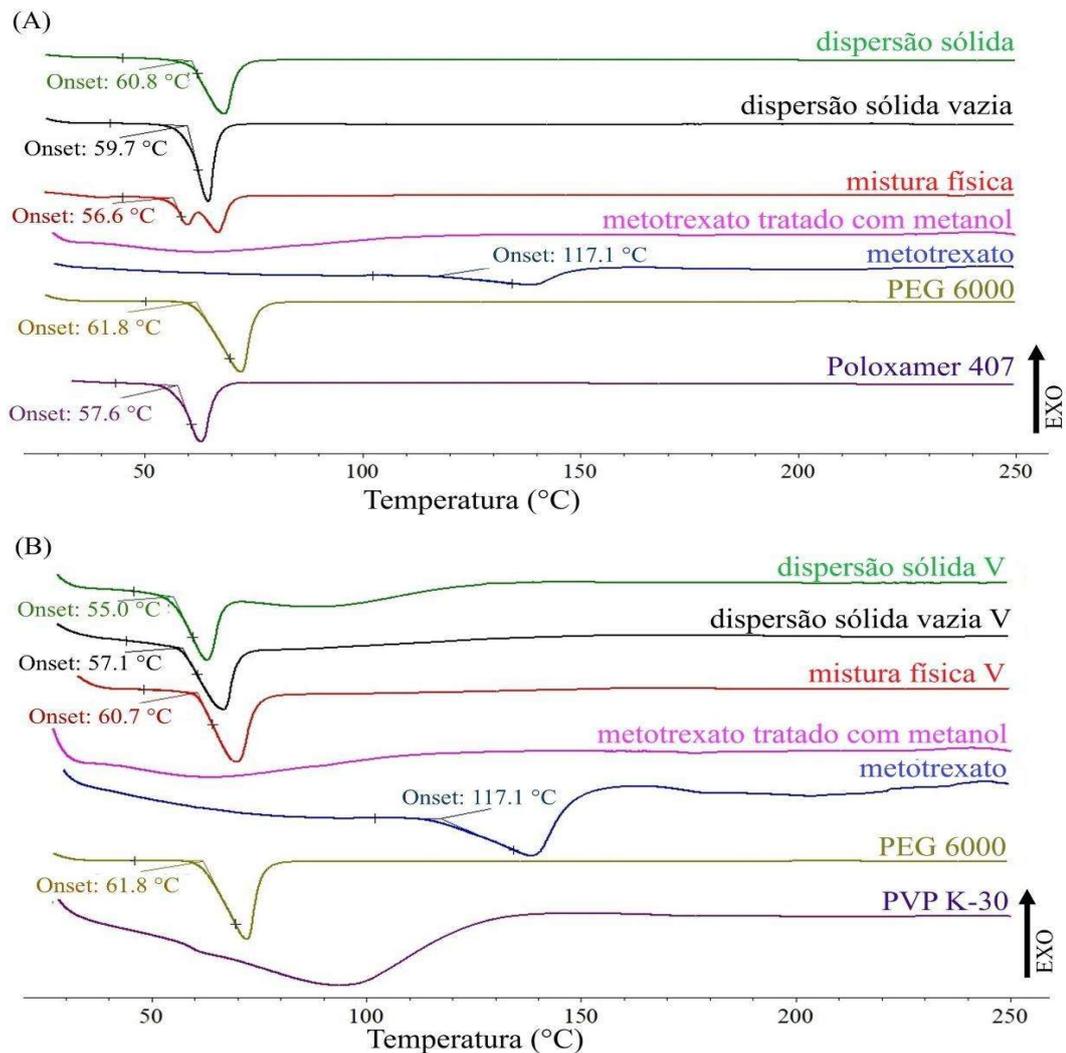
Tipo de estiramento	Número de ondas (cm ⁻¹)										
	P407	PVP K-30	PEG 6000	MT X	MTX-MeOH	DS U	DS U vazia	MF U	DS V	DS V vazia	MF V
Estiramento C-O-C	1113	-	1111	-	-	1113	1116	1113	-	-	-
Estiramento C=O de amida	-	1659	-	1645	1641	-	-	-	1661	1660	1659
Sobreposição de estiramento N-H de aminas primárias e de amida	-	-	-	3367	3363	-	-	-	-	-	-
Estiramento aromáticos C=C	-	-	-	1603 e 1498	1604 e 1506	-	-	-	-	-	-
Estiramento C-O de ácidos carboxílicos	-	-	-	1404 e 1207	1404 e 1205	-	-	-	-	-	-
Estiramento C-H alifático	2887	-	2887	-	-	2887	2881	2885	2887	2885	2887
Estiramento -OH	-	3455	3439	-	-	3429	3439	-	3450	-	3444
Estiramento C-O do grupo éter	1113	-	1113	-	-	1113	1116	1113	-	-	-
Estiramento C—H dos grupos metileno	-	2956	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor (2024).

5.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 8 mostra as curvas de DSC das DSs U e V, com as correspondentes MFs fármaco-polímeros, das DSs vazias U e V, do MTX livre, do MTX tratado com metanol e dos polímeros P407, PEG 6000 e PVP K-30.

Figura 8 – A e B: Curvas de DSC das DSs U e V, das DSs U e V vazias, das MFs U e V, do MTXMeOH, do MTX e dos polímeros PEG 6000, P407 e PVP K-30.



Fonte: Do autor (2024).

Nota: Figura 8 – A: Curvas de calorimetria exploratória diferencial: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 (dispersão sólida U, em verde); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 (mistura física U, em vermelho); DS U vazia (em cinza); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo); B: Curvas de calorimetria exploratória diferencial: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e PVP K-30 (dispersão sólida V, em verde); DS V vazia (em cinza); mistura física de MTX com PEG 6000 e PVP K-30 (mistura física V, em vermelho); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e PVP K-30 (em roxo).

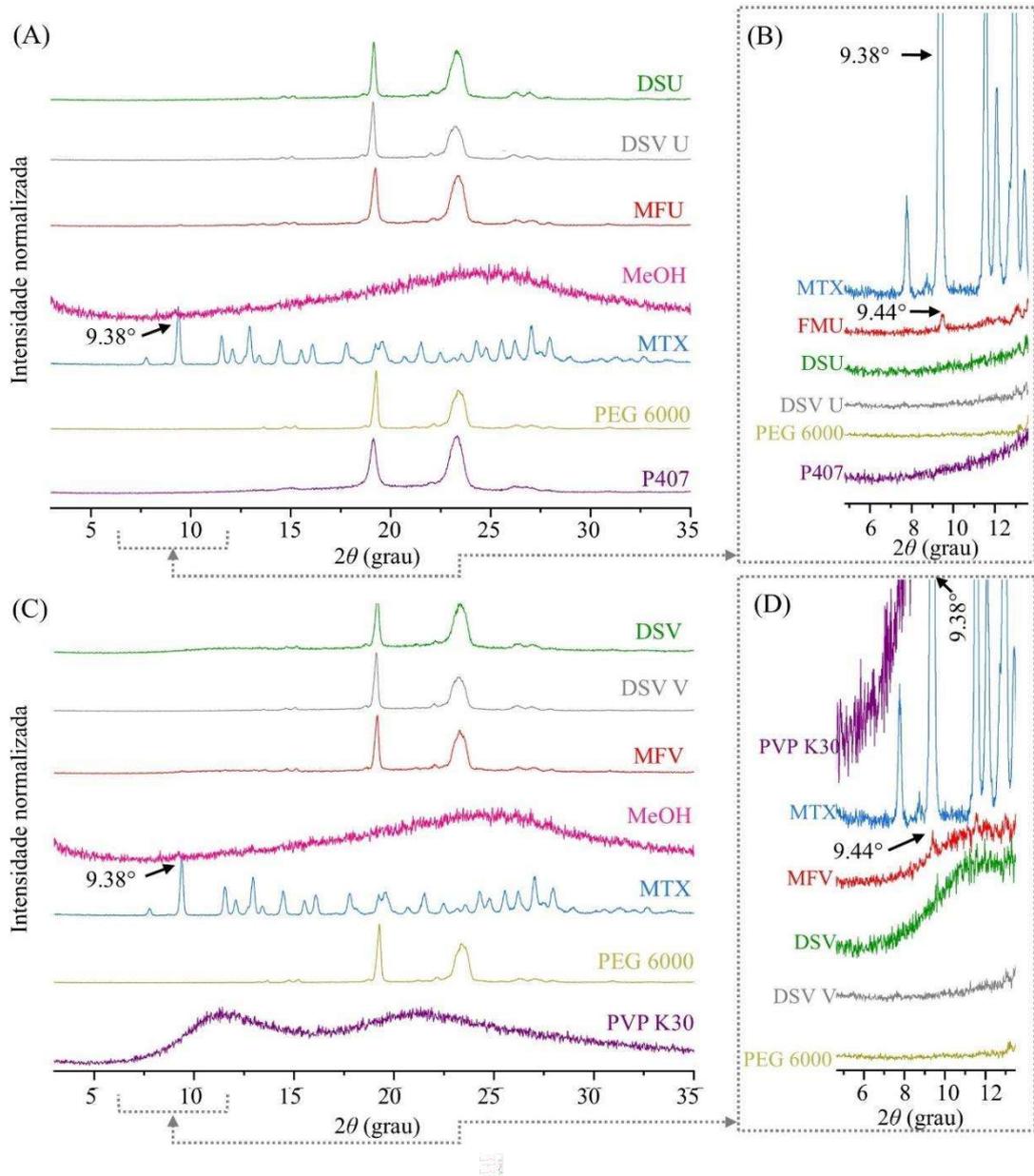
A curva de DSC da DS U obtida com PEG 6000 e P407 mostrou evento endotérmico único com início em 60,8 °C, com valores intermediários em relação a fusão de PEG 6000 (61,8 °C) e P407 (57,6 °C), enquanto na curva da mistura física observou-se a fusão dos polímeros separadamente. O ponto de fusão mostrado na curva de DSC do MTX, com T_{onset} de 117,1°C, foi diferente do que Oliveira (2013) obteve em seus estudos, cujo o valor de T_{onset} foi de 237,0°C (Oliveira, 2013). A fusão do MTX (117,1°C) não foi observada nas curvas da dispersão sólida e da mistura física, o que indica que o fármaco tenha sido solubilizado pelos polímeros. A fusão do MTX (117,1°C) não foi observada na curva de DSC do MTX tratado com metanol, demonstrando que o fármaco está no estado amorfo.

A curva de DSC da DS V contendo PEG 6000 e PVP K-30 apresentou evento endotérmico em 55,0 °C, com temperatura inferior aos seus excipientes e valores inferiores à fusão dos componentes isolados, sugerindo uma mistura eutética, um tipo de dispersão sólida, de acordo com Mooter (2012).

5.10 Difração de raios x

A Figura 9 mostra os difratogramas da DS composta por MTX, PEG 6000 e P407 (amostra U), da DS vazia composta por PEG 6000 e P407, da correspondente mistura física (MF) fármaco-polímeros, do MTX, do MTX tratado com metanol e dos polímeros PEG 6000 e P407. O PEG 6000 e P407 são polímeros cristalinos e exibiram picos de Bragg bem definidos em 19,28° 2 θ (PEG 6000), 19,14° 2 θ (P407) e 23,30° 2 θ (ambos), o que está em consonância com dados previamente reportados (Ei-Badry et al., 2013; Patil; Gaikwad, 2015). Padrões de difração muito semelhantes foram observados para DS U e MF U, os quais apresentam picos de difração nos mesmos ângulos que os polímeros utilizados. As pequenas variações nos ângulos de difração podem ser decorrentes de deslocamento durante a medida. São observadas diferenças nas intensidades relativas dos picos, porém, elas somente seriam conclusivas para análise após realização de refinamento de Rietveld e, portanto, a análise não foi executada porque não foram encontradas estruturas de P407 e PEG 6000 no Cambridge Structural Database (CSD). O difratograma de MTX apresentou vários picos de Bragg de média e baixa intensidade e um mais intenso em 9,4 °2 θ , confirmando sua natureza cristalina (Dedroog et al., 2020). A ampliação desses difratogramas (Figura 9B) revelou que o pico de Bragg a 9,4 ° 2 θ é específico do MTX, uma vez que está ausente nos difratogramas dos polímeros PEG 6000 e P407. A notificação da presença deste pico de Bragg exclusivamente na mistura física U e sua ausência na amostra DS U confirmam a amorfização do MTX nesta última.

Figura 9 A e C – Perfis de difratogramas das DSs U e V, das DSs U e V vazias, das MFs U e V, do MTXMeOH, do MTX e dos polímeros PEG 6000, P407 e PVP K-30. Figuras 9 B e D: expansões das figuras 9A e C de 6° para 12° 2 θ .



Fonte: Do autor (2024).

Nota: Figura 9 A e C: Perfis de difratogramas: dispersão sólida de metotrexato (MTX) em PEG 6000 e P407 (dispersão sólida U ou V, em verde); dispersão sólida vazia contendo somente polímeros PEG 6000 e PVP K-30 (dispersão sólida vazia, em cinza); mistura física de MTX com PEG 6000 e P407 ou PVP K-30 (mistura física U ou V, em vermelho); MTX livre (em azul); MTX tratado com metanol (em rosa); PEG 6000 (em cáqui) e P407 (em roxo). As figuras 9A e C foram expandidas de 6° para 12° 2 θ (figuras B e D, respectivamente) para mostrar um pico de MTX encontrado nas misturas físicas e ausente em DS U.

A Figura 9 C mostra os difratogramas de DS composta por MTX, PEG 6000 e PVP K-30 (amostra V), da DS vazia composta por PEG 6000 e PVP K-30, da correspondente mistura física (MF) fármaco-polímeros, do MTX livre, do MTX tratado com metanol e dos polímeros PEG 6000 e PVP K-30. A DS V, MF V e PEG 6000 apresentaram o mesmo padrão de difração,

com dois picos de Bragg intensos em $19,12-19,28^{\circ}2\theta$ e $23,18-23,38^{\circ}2\theta$. O difratograma de PVP K-30 apresentou aspecto característico de polímero amorfo com ausência de qualquer pico de Bragg dentro do intervalo analisado. Notavelmente, a ampliação dos difratogramas (Figura 9D) não possibilitou a confirmação da ausência do pico de Bragg a $9,4^{\circ} 2\theta$ em DS V devido à interferência do PVP K-30 nesta região. Essa impossibilidade faz com que permaneça inconclusiva a ocorrência da amorfização do MTX contido na DS V.

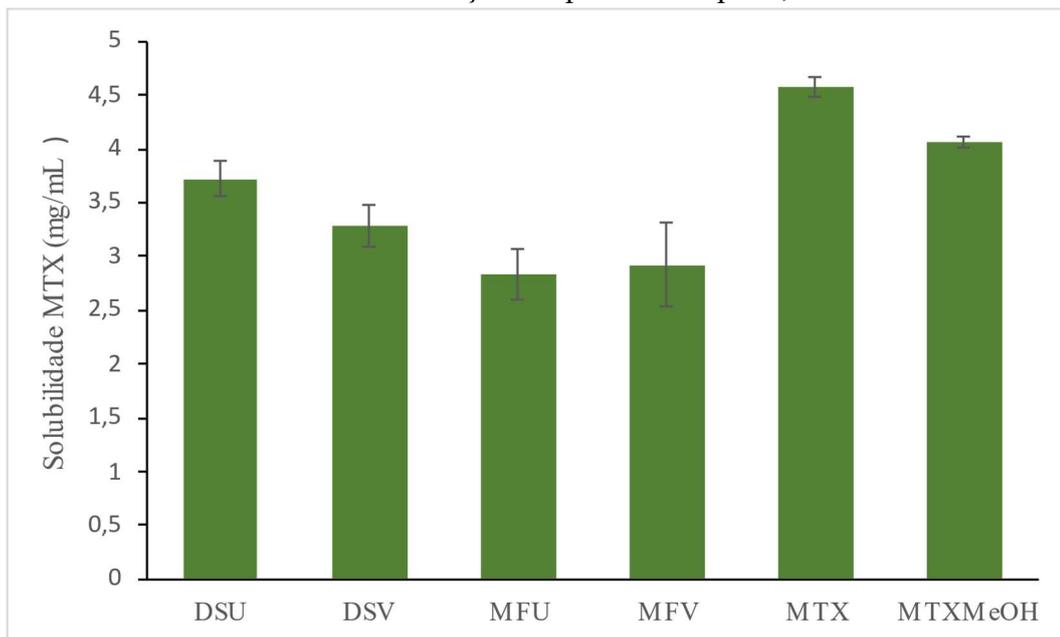
O tratamento do MTX com metanol induziu a amorfização do fármaco, sendo evidenciado pela ausência de sinais cristalinos no difratograma da DS U. Assim, concluiu-se que o tratamento com metanol contribui para a amorfização do MTX, tanto de forma independente quanto na presença de polímero como ocorreu na DS U.

5.11 Estudo de solubilidade

A Figura 10 mostra o gráfico dos perfis de solubilidade das DSs U e V, das MFs U e V, do MTX livre e do MTX tratado com metanol. Os dados demonstraram que a solubilidade do MTX ($4,57 \pm 0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$) não foi significativamente diferente do MTX tratado com metanol ($4,06 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$), $p = 0,11$, mostrando que a amorfização não provocou aumento da solubilidade do MTX, ao contrário dos dados relatados por Chan e Gonda (1990), cujos os resultados encontrados demonstraram um aumento de 4 vezes na solubilidade do MTX amorfizado em água destilada durante 48h.

As misturas físicas, MF U ($2,82 \pm 0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$) e MF V ($2,92 \pm 0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$) ($p = 0,99$) apresentaram solubilidades semelhantes, porém, inferiores a do MTX livre, sugerindo que os polímeros existentes nessas misturas impediram a liberação de MTX. Os valores de solubilidade das DSs U ($3,72 \pm 0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$) e V ($3,28 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$) demonstraram equivalência estatística ($p = 0,21$), mas, com valores apresentados inferiores ao MTX livre. Embora a solubilidade do DS U demonstrou ser menor que o MTX livre ($p = 0,00$), pode ser considerada equivalente a do MTX tratado com metanol ($p = 0,43$) e maior que a da MF U ($p = 0,00$). A solubilidade da DS V e da MF V não apresentaram diferenças ($p = 0,37$). Esses dados encontrados negam a hipótese de que a amorfização do MTX contido na dispersão sólida melhora a solubilidade do fármaco.

Figura 10 - Perfis de solubilidade das DSs U e V, das MFs U e V, do MTX livre e do MTX tratado com metanol em solução tampão fosfato pH 6,8.



Fonte: Do autor (2024)

6 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, o principal objetivo foi desenvolver uma estratégia farmacêutica para melhorar a solubilidade do fármaco MTX, pertencente à classe IV do SCB.

O desenvolvimento da estratégia farmacêutica DS foi realizado por meio do emprego dos excipientes DGME, P188, P407, PVP K-30 e PEG 6000. As DSs contendo DGME e/ou P188 apresentaram aspecto líquido devido o Transcutol se encontrar no estado líquido em temperatura ambiente, sendo que a temperatura de secagem não foi capaz de solidificá-lo, e a concentração de P188 usada favorece a formação de gel. As DSs compostas por P407 e PVP K-30 apresentaram separação de fase devido à falta de miscibilidade mútua. As DSs contendo P407, PVP K-30, PEG 6000 ou combinação de P407 ou PVP K-30 e PEG 6000 foram as amostras que resultaram no aspecto sólido característico de DSs. Logo, o delineamento experimental para a escolha dos polímeros, somado à técnica de evaporação do solvente, culminou positivamente para a possibilidade de obtenção de dispersões sólidas.

Os difratogramas obtidos confirmaram a amorfização do MTX em DS U e demonstraram que a metodologia usada induziu a amorfização do fármaco na ausência ou na presença dos excipientes. Além disso, os resultados obtidos por DSC e FTIR da DS U, em comparação com os da MF e dos excipientes, sugerem a formação de um novo sistema. Estes resultados contrastam com os anteriores do grupo de Giri e colaboradores e Agafonov e colaboradores, em que o MTX continuou na forma cristalina (Giri *et al.*, 2021; Agafonov *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos pelo estudo de solubilidade demonstraram que as DSs U e V apresentaram menor solubilidade em solução tampão fosfato pH 6,8 em comparação com o fármaco livre. Essa redução na solubilidade pode ser devido a ocorrência de interação do fármaco com os excipientes, o que provavelmente provoca o retardamento da dissolução do MTX.

Resultados encontrados pelo grupo de Agafonov e colaboradores foram semelhantes, usando também o polímero hidrofílico e solubilizante P407. O preparado DS foi pelo método de fusão a 70°C e posteriormente solidificou em temperatura ambiente. Os resultados de PXRD demonstraram que o MTX apresentava uma cristalinidade. As curvas de DSC da MF e DS mostraram uma semelhança de Tmax e indicaram uma ausência de interações químicas entre MTX e P407. Os espectros de FTIR da mistura física e da dispersão sólida apresentaram comportamentos idênticos, mostrando bandas típicas do MTX e do polímero. Os resultados mostraram que a influência do P407 foi insignificante na solubilidade do MTX em solução tampão fosfato pH 6,8. A solubilidade aparente do MTX contido na MF e na DS mostrou uma

diferença nos limites de erro. A liberação de MTX livre foi consideravelmente mais rápida, 80% foram atingidos em aproximadamente em 45 min, em solução tampão fosfato pH 6,8 e FaSSIF. Porém a MF e a DS tiveram 80% em peso liberado em 1,5–2 h. Assim, a presença de P407 em meio pH 6,8 provoca uma diminuição na liberação de MTX (Agafonov *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a amorfização do MTX não afetou a solubilidade, assim como a presença dos polímeros não promoveu a solubilização. Os resultados deste trabalho associados com os do grupo de Agafonov e colaboradores sugerem que o efeito da dispersão sólida com fármaco cristalino ou amorfo na solubilidade é insignificante.

Comparando a influência de outros polímeros, o grupo de Alali e colaboradores preparou DS de MTX com PEG 4000 ou PVP-K30 pelo método de evaporação do solvente. A combinação do fármaco com os polímeros não provocou mudanças significativas nas posições das bandas distintas do MTX, mostradas em seu espectro de FTIR. O estudo de liberação *in vitro* por célula de difusão de Franz com membrana semipermeável e meio de difusão solução tampão fosfato pH 7 resultou em uma dissolução de cerca de 2,5 vezes maior que o fármaco livre (Alali *et al.*, 2022).

O grupo de Giri e colaboradores preparou DS pelo método de evaporação do solvente, em que o MTX foi disperso em meio aquoso como alternativa para evitar solventes orgânicos, usando uma suspensão de MTX não dissolvida para evitar instabilidade do fármaco. As DSs foram obtidas após a secagem da suspensão por atomização, tendo o emprego dos polímeros hidrofílicos carboximetilcelulose de sódio (Na-CMC) e lauril sulfato de sódio (SLS). Os resultados de DSC, PXRD e FTIR mostraram que o fármaco ainda se encontrava na forma cristalina. A solubilidade da DS em água foi de 2,2 mg.mL⁻¹, apresentando um aumento considerável em relação ao fármaco livre, que é praticamente insolúvel em água. A biodisponibilidade oral geral aumentou em 2,8 vezes em comparação com o fármaco livre quando testada em ratos Sprague-Dawley, mas sem realizar a comparação com o grupo controle de MF para verificar se era a dispersão sólida ou a presença dos polímeros que aumentou a biodisponibilidade (Giri *et al.*, 2021).

Estudos com grupos de controle adicionais são necessários para verificar a existência de um equilíbrio positivo substancial entre os benefícios e custos associados ao emprego da técnica de dispersão sólida, embora os estudos do grupo de Alali e colaboradores e do grupo de Giri e colaboradores tenham demonstrado um aumento favorável de duas vezes na dissolução ou biodisponibilidade do MTX (Alali *et al.* 2022; Giri *et al.*, 2021).

A solubilidade do MTX livre é aproximadamente $2,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão bio-relevante em pH 7,4 de acordo com estudos anteriores (Figuerola et al., 2021). Neste trabalho, o MTX livre apresentou em solução tampão fosfato em pH 6,8 uma solubilidade de $4,9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esse achado demonstra que simplesmente basta ajustar o pH para que aumente a solubilidade do MTX em duas vezes, o que gera questionamento sobre a necessidade de métodos de fabricação complexos, como o método de secagem por pulverização, para produzir DSs, sendo que um simples ajuste de pH pode produzir ganhos de solubilidade semelhantes. O simples aumento da solubilidade do MTX em duas vezes proporcionado pela técnica de DS pode não justificar as desvantagens associadas. As desvantagens do uso dessa técnica são as seguintes: o uso de solventes orgânicos tóxicos durante o emprego da técnica de evaporação do solvente e as possíveis preocupações regulatórias e ambientais.

Portanto, os resultados deste trabalho associados ao estado da técnica possibilitam a concluir que a tecnologia farmacêutica dispersão sólida não pode ser considerada uma plataforma de entrega de fármacos mais apropriada para melhorar a solubilidade do MTX. A amorfização do fármaco e a dispersão sólida tradicional contendo MTX na forma cristalina não proporcionou um passo inventivo na melhoria da solubilidade do MTX. Fatores como a conformação da cristalinidade, a influência de diferentes polímeros, os processos de fabricação e a interação de polímeros não provocaram um efeito sinérgico considerável na solubilidade do MTX.

Esta discussão indica a necessidade de verificar criticamente a verdadeira aplicabilidade da DS como uma plataforma promotora de aumento da solubilidade do MTX. Embora exista um desafio substancial contínuo para melhorar a solubilidade do MTX, abordagens alternativas, como a nanoencapsulação, podem promover soluções promissoras. A modificação do revestimento e do tamanho das partículas dos nanocarreadores, proporciona o aprimoramento do transporte ativo e passivo através de barreiras biológicas (Wang et al., 2023), promovendo potencialmente uma superação das limitações físico-químicas que impedem a eficácia biológica do MTX.

Este trabalho fornece informações preciosas para os cientistas farmacêuticos que investigam os princípios fundamentais das DSs baseadas em MTX. Além disso, este estudo disponibiliza uma comparação crítica com o método existente, analisando uma estrutura inovadora de DS de MTX amorfa composta pelos polímeros P407, PVP-K30 e PEG 6000, realizando uma opinião crítica sobre o emprego da DS para MTX.

Esses resultados contribuem para compreender melhor a empregabilidade e as limitações da plataforma de liberação de fármacos por DS para melhorar a solubilidade do MTX.

7 CONCLUSÕES

Foi possível obter com sucesso dispersões sólidas de MTX, empregando polímeros como P407 ou PVP K-30 e PEG 600, pela técnica de evaporação do solvente.

A análise de difração de raios X confirmou a amorfização de MTX na amostra DS U. No entanto, uma caracterização adicional é necessária para confirmar a amorfização de MTX na amostra DS V.

De acordo com dados obtidos no estudo de solubilidade, pode-se concluir que o perfil de solubilidade da DS U foi superior aos das MFs U e V, porém, o perfil da DS V foi equivalente aos das MFs U e V. Embora os resultados provam que a obtenção de dispersões sólidas com MTX amorfo seja viável, os dados não demonstraram melhoria na solubilidade do MTX. A comparação crítica dos resultados com os estudos existentes sugere que a dispersão sólida pode ser uma tecnologia farmacêutica limitada para melhorar a solubilidade do MTX.

Portanto, existe a necessidade de pesquisas adicionais para verificar o potencial existente e as limitações dessa tecnologia e considerar as alternativas que podem solucionar eficazmente o problema de baixa solubilidade do MTX.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, A. B. A. *et al.* Amorphous solid dispersions: utilization and challenges in preclinical drug development within astrazeneca. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 614, p. 121387, 2022. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121387.
- AGAFONOV, M.; IVANOV, S.; TEREKHOVA, I. Improvement of pharmacologically relevant properties of methotrexate by solid dispersion with Pluronic F127. **Materials Science and Engineering C**, v. 124, p. 112059, Jan. 2021. doi: 10.1016/j.msec.2021.112059.
- ALALI, M. M. M. A. *et al.* Improving solubility of methotrexate by solid dispersion. **Int. J. Applied Pharm.**, v. 15, n. 1, p. 173 – 177, 2023.
- ALVAREZ-FIGUEROA, M. J.; DELGADO-CHARRO, M. B.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. **Int. J. Pharm.**, v. 212, n.1, p. 101 - 107, 2021. doi: 10.1016/s0378-5173(00)00599-8.
- ANUPAM, S. *et al.* Different analytical method used for the estimation of methotrexate in rheumatoid arthritis. **American Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 132, 2022.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Appendix F: guidelines for standard method performance requirements**. [S.l]: AOAC, 2016.
- ASHOOR, J. A.; GHAREEB, M. M. Formulation and in-vitro evaluation of methotrexate nanoemulsion using natural oil. **International Journal of Drug Delivery Technology**, v. 12, n. 2, p. 670 – 677, 2022.
- BARBOSA, Jahamunna Abrantes Andrade. **Preparação e caracterização de complexos multicomponentes contendo ciclodextrinas com metotrexato**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Bioanálises e Medicamentos) – Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2012. Disponível em: [https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/13501/1/Preparacao Caracterizacao Complexos_Barbosa_2012.pdf](https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/13501/1/Preparacao%20Caracterizacao%20Complexos_Barbosa_2012.pdf). Acesso em: 05 jul. 2023.
- BHUJBAL, S. V. *et al.* Pharmaceutical amorphous solid dispersion: a review of manufacturing strategies. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 8, p. 2505 – 2536, 2021. doi: 10.1016/j.apsb.2021.05.014.
- BIORENDER. **Create professional science figures in minutes**. [S.l]: Biorender, [202 -]. Disponível em: <https://www.biorender.com>. Acesso em: 23 set. 2024.
- BOLOURCHIAN, N.; PANAH, M. S. The effect of surfactant type and concentration on physicochemical properties of carvedilol solid dispersions prepared by wet milling method. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, 2022.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União nº 141**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 16 ago. 2023.

BUCHI. **Rotary evaporation technique & distillation process**. [S.l.]: BUCHI, [202-]. Disponível em: [https://www.buchi.com/en/knowledge/technologies/rotary evaporation](https://www.buchi.com/en/knowledge/technologies/rotary%20evaporation). Acesso em: 23 set. 2024.

CAVALCANTE, Julie Anne Pereira. **Design de sistema biopolimérico de membrana de celulose bacteriana e microagulha com liberação de metotrexato para aplicações dermatológicas**. 2023. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2023. Disponível em: [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/57172/1/DISSERTA %c3%87%c3%83O%20ulie%20Anne%20Pereira%20Cavalcante.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/57172/1/DISSERTA%20c3%87%20c3%83O%20ulie%20Anne%20Pereira%20Cavalcante.pdf). Acesso em: 05 jul. 2023.

CARRETERO, G. *et al.* Guidelines on the use of methotrexate in psoriasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 101, n. 7, p. 600 – 613, 2010. doi:10.1016/S1578-2190(10)70682-X.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE. **Access structures**. Compound name (methotrexate). Cambridge: CCDC, [202-]. Disponível em: [https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Compound=Methotrexate & Database To Search=Published](https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Compound=Methotrexate&DatabaseToSearch=Published). Acesso em: 16 set. 2024.

CHAN, H.-K.; GONDA, I. Methotrexate: existence of different types of solid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 68, n. 1 – 3, p. 179 – 190, 1990.

CHAN, S. Y. *et al.* The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 5, p. 372–385, 2015. doi: 10.1016/j.ajps.2015.04.003.

CHAUDHARI, S. P.; DUGAR, R. P. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 68 – 77, 2017. doi: 10.1016/j.jddst.2017.06.010.

DEDROOG, S. *et al.* Solid-state analysis of amorphous solid dispersions: why dsc and xrpd may not be regarded as stand-alone techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 178, p. 112937, 2020.

DEMIRBOLAT, G. M. *et al.* New approach to formulate methotrexate-loaded niosomes: in vitro characterization and cellular effectiveness. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 17, n. 3, p. 622 – 637, 2022.

E, M.; P, S.; R, S. Atomization techniques in spray drying: a review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 10, n. 5, p. 454 – 461, 2021.

EI-BADRY, M. *et al.* Performance of Poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide. **Farmacia Journal**, v. 61, n. 6, p. 1137 – 1150, 2013.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION. **Opinion on transcutol**. [S.l.]: ECH&CP, 2006. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_082.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Nordimet - methotrexate**. [S.l.]: EMA, 2016. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/nordimet-epar-public-assessment-report_en.pdf. Acesso em: 07 ago. 2023.

FIGUEROA, M. J. A.; CHARRO, M. B. D.; MÉNDEZ, J. B. Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. **Int. J. Pharm.**, v. 212, n.1, p. 101-7, 2021. doi: 10.1016/s0378-5173(00)00599-8.

GIRI, B. R. *et al.* Improved bioavailability and high photostability of methotrexate by spray-dried surface-attached solid dispersion with an aqueous medium. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 111, 2021. doi:10.3390/pharmaceutics13010111.

GIRI, B. R. *et al.* Alternative methotrexate oral formulation: enhanced aqueous solubility, bioavailability, photostability, and permeability. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, 2022.

GUNTAKA, P. R.; LANKALAPALLI, S. Solid dispersion - a novel approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs in solid oral dosage forms. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 12, n. 2, p. 17 – 26, 2019.

GURUNATH, S. *et al.* Amorphous solid dispersion method for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **JOPR: Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 4, p. 476 – 480, 2013. doi: 10.1016/j.jopr.2013.04.008.

HAMED, K. M. *et al.* Overview of methotrexate toxicity: a comprehensive literature review. **Cureus**, v. 14, n. 9, p. 2 – 9, 2022.

HASHEMZADEH, N.; JOUYBAN, A. Review of pharmaceutical applications of diethylene glycol monoethyl ether. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 349 – 353, 2022.

HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS. **Guia farmacêutico - metotrexato (MTX)**. [S. l.]: HSL, 2017. Disponível em: <https://guiafarmacutico.hsl.org.br/metotrexato>. Acesso em: 20 set. 2024.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. ICH Q2(R2) - validation of analytical procedures. **ICH**, v. 2, p. 1–34, Mar. 2022. Disponível em: [https:// database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29_Guideline.pdf). Acesso em: 20 set. 2023.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. ICH guideline Q3C (R5) on impurities: guideline for residual solvents. **ICH**, p. 1-26, Aug. 2011. Disponível em: [https:// database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C-R8_Guideline_Step4_2021_0422_1.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C-R8_Guideline_Step4_2021_0422_1.pdf). Acesso em: 15 nov. 2023.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008**. INMETRO, v. 5, p. 1 – 31, 2016.

ISMAIL, M. Y.; GHAREEB, M. M. Enhancement of the solubility and dissolution rate of rebamipide by using solid dispersion technique (part I). **Iraqi J Pharm Sc**, v. 27, n. 2, p. 55 – 65, 2018.

JAHNAVI, V. N. S. *et al.* A comprehensive review on solid dispersions. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1311 – 1326, 2020.

KIM, D. S. *et al.* Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for improved oral delivery and photostability of methotrexate. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4949 – 4960, 2019.

Acesso em: 05 jul. 2023.

PANDI, P. *et al.* Amorphous solid dispersions: an update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 586, n. 14, p. 119560, 2020. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119560.

PATIL, M. P.; GAIKWAD, N. J. Characterization of gliclazide-polyethylene glycol solid dispersion and its effect on dissolution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 161 – 166, 2015.

PEDREIRO, Liliane Neves. **Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina**. 2013. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/1421f945-4ddf-4a13-ba0d-6b2223670fd9/content>. Acesso: 05 jul. 2023.

PINTO, Larissa Alvarenga. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para aplicação tópica de metotrexato: estudo da bioadesão e ensaios biológicos in vitro**. 2012. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e74bd2ab-11c9-4709-88bf-5ab9d6897117/content>. Acesso em: 05 jul. 2023.

POLITIS, S. N. *et al.* Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 889 – 901, 2017.

POWAR, T. *et al.* Development and evaluation of lyophilized methotrexate nanosuspension using quality by design approach. **Acta Chimica Slovenica**, v. 68, n. 4, p. 861 – 881, 2021.

PUBCHEM. **Methotrexate - pubchem compound summary**. National Library of Medicine, n. CID 126941, 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methotrexate>. Acesso em: 16 ago. 2023.

RAJALINGAM, K. *et al.* Solubility enhancement of methotrexate by solid nanodispersion approach for the improved treatment of small cell lung carcinoma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 140 – 150, 2020.

ROLIM-NETO, P. J. *et al.* Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II: efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences)**, v. 36, n. 2, p. 239 – 249, 2015.

SANTOS, D. *et al.* Spray drying: an overview. **IntechOpen**, v. 1, n. 1, p. 9 – 35, 2017. doi: 10.5772/intechopen.72247.

SHARMA, K. S. *et al.* Solid dispersions: a technology for improving bioavailability. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 127 – 133, 2019.

TORRES, R. P.; SANTOS, F. P.; BRANCO, J. C. Methotrexate: implications of pharmacogenetics in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 1, n. 3, p. 225 – 229, 2022.

TRAN, P. *et al.* Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 1 – 26, 2019.

WANG, D. *et al.* Nanocarriers transport across the gastrointestinal barriers: the contribution to oral bioavailability via blood circulation and lymphatic pathway. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 203, n. 115130, 2023. doi: 10.1016/j.addr.2023.115130.

YOUSEFI, G. *et al.* Synthesis and characterization of methotrexate polyethylene glycol esters as a drug delivery system. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 147 – 153, 2010.

YU, W. J. *et al.* Polymeric nanoscale drug carriers mediate the delivery of methotrexate for developing therapeutic interventions against cancer and rheumatoid arthritis. **Frontiers in Oncology**, v. 10, Sept. 2020.