



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

RITA DE CÁSSIA DA SILVA ASCENÇÃO BARROS

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE
NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO ORAL DE SILDENAFILA

RIO DE JANEIRO

2014

Rita de Cássia da Silva Ascensão Barros

Desenvolvimento e Avaliação da Eficácia de
Novos Sistemas de Liberação Oral de Sildenafil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral
Prof^a. Dr^a. Flávia Almada do Carmo

Rio de Janeiro

2014

B277d Barros, Rita de Cássia da Silva Ascensão.

Desenvolvimento e avaliação da eficácia de novos sistemas de liberação oral de sildenafila/ Rita de Cássia da Silva Ascensão Barros; orientadores Lucio Mendes Cabral, Flávia Almada do Carmo. – Rio de Janeiro : UFRJ, Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2014.

103f. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Sildenafil. 2. Sistemas autoemulsionantes. 3. Hipertensão arterial pulmonar. 4. Disfunção erétil. I. Cabral, Lucio Mendes. II. Carmo, Flávia Almada do. III. Título.

CDD 615.19

Rita de Cássia da Silva Ascensão Barros

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE
NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO ORAL DE SILDENAFILA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Flávia Almada do Carmo
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos
Faculdade de Farmácia – UFRJ
(Revisor)

Prof^a. Dr^a. Magaly Girão Albuquerque
Instituto de Química – UFRJ

Prof. Dr. Wilson da Costa Santos
Faculdade de Farmácia – UFF

Por tudo que me ensinaram e ensinam, dedico este trabalho aos meus pais, ao Professor Nuno Álvares Pereira e demais grandes professores que tive, aos meus filhos e aos meus alunos nesses trinta anos de Magistério.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela família e amigos que me deu.

Aos meus pais Fernandes e Maria Rita, a quem devo tudo em minha vida. Aos seus exemplos de dignidade, fé, coragem, ternura e trabalho. Obrigada pelo carinho e pelo cuidado de vocês que, graças a Deus, me acompanham até hoje.

Aos meus irmãos Agostinho e Cezar, por todo o cuidado e proteção à irmã caçula e pela infância cercada de sonhos que dividimos. Pelos filhos e pais maravilhosos que são e pelo exemplo que foram e são para mim.

Ao Jaime, por estes trinta e sete anos de parceria e por tudo que construímos juntos. Pelos filhos maravilhosos que temos e que tanto te admiram, pelo exemplo de homem e profissional que você é. Obrigada por eu sempre poder contar com teu abraço. Você sabe que “Quando estou com você, estou nos braços da paz” e ainda que “Meu riso é tão feliz contigo, o meu melhor amigo é o meu amor”.

Aos meus filhos Tiago e Lucas. Dois homens de bem. Dois filhos adorados que me fazem ter a certeza de que só por eles minha vida já valeu a pena, pois são o que há de melhor nela. Meus diamantes, Deus os abençoe e proteja sempre.

Aos meus amados sobrinhos Cezar e Pedro, Jayme e Eduardo, Leonardo, Luisa e João Pedro, obrigada por enriquecerem minha vida com a alegria e as conquistas de vocês e ainda pelo enorme carinho e juventude que emprestam à Tia Cássia.

Às minhas cunhadas Lúcia e Fábria, por nossa amizade, pelo amor que dispensam aos meus pais, aos meus irmãos, aos meus sobrinhos e aos meus filhos.

À Bia e à Ju, por amarem meus filhos. “Quem beija os meus filhos, a minha boca adoça”. Obrigada norinhas pelo carinho de vocês.

Ao Professor Carlos Rangel Rodrigues, por me fazer voltar a sonhar. Por acreditar mais em mim do que eu mesma e me fazer ver que ainda posso contribuir um pouco mais com meu trabalho para a nossa Faculdade.

Ao Professor Lucio Mendes Cabral, pela orientação deste trabalho, por acreditar e me incentivar para a realização deste sonho, quando eu nem mais ousava sonhar. Obrigada, professor, por tudo que me fez aprender. Pelo apoio total e, sobretudo, pela sua amizade e cuidado. Mais uma vez, obrigada SEMPRE.

À Professora Flávia Almada do Carmo, que muito mais que orientadora, foi também um anjo da guarda. Obrigada, Flavinha, pelo seu apoio total, sua ajuda, confiança, cuidado e carinho, seus sorrisos e seus abraços. Teria sido muito mais difícil sem você, linda menina.

Às Professoras Elisabete Pereira dos Santos e Mirian Ribeiro Leite Moura, por toda a disponibilidade e auxílio na Banca de Acompanhamento. Obrigada pelo incentivo constante e pela amizade efetivamente demonstrada.

Ao Professor Luis Cláudio Rodrigues Pereira da Silva, o meu querido Lula, pela ajuda em diversos momentos e sem que eu precisasse solicitar. Obrigada por seu cuidado e carinho, que me fizeram ver que sempre posso contar contigo.

À Professora Aline Guerra Mansour Fraga, agradeço o carinho e atenção, seu incentivo, alegria e seus sorrisos contagiantes e seus abraços que sempre chegam nas horas certas.

À Mariana da Volta, minha filhinha do coração, obrigada por toda a ajuda, apoio e carinho que foram fundamentais para eu me tornar doutora. Que bom poder contar com você aqui na Farmácia Universitária, minha pequenina Grande Farmacêutica. Que Deus te abençoe e proteja sempre e te faça feliz.

Ao Duduzinho, agora Professor Eduardo Rodrigues da Silva, por todos os momentos em que precisei me ausentar do Laboratório de Manipulação para me dedicar ao doutorado,

e ele com muita competência e dedicação assumiu o comando. Muito obrigada, meu filho, você é motivo de orgulho para seus antigos professores.

Aos amigos do LabTIF, Arídio, Carol Pupe, Lilian, Samantha, Luis, Valério, Pedrinho, Lulu, Jaque, Plínio, Gil, Carol Escudini, Paloma, agradeço o apoio e os momentos de descontração que dividimos. Um agradecimento especial à Letícia Coli pela enorme ajuda na CLAE. Valeu Lelê!

À Isabela Viol, minha competente e trabalhadora aluna de Iniciação Científica, que tanto me ajudou em todas as etapas deste trabalho. Obrigada Belinha, minha bela.

À Professora Valéria Pereira de Sousa, do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ-UFRJ), por seu apoio e por permitir a realização das análises de CLAE e refratometria em seu laboratório. Aos amigos Alice, Eliane, Eduardo, Luis, Vinicius, Tailane e Victor pelo acolhimento e ajuda.

Ao Professor Alexandre dos Santos Pyrrho, pela colaboração na realização dos Ensaios de Toxicidade. Agradeço por sua competência e gentileza.

À amiga Cleonice Marques Costa, companheira de estudos e dos desesperos desta jornada. Cleo, obrigada por todo o teu apoio em tantos momentos de superação que tive que atravessar, nos quais você sempre se fez presente. Nossos doutorados precisam ser muito comemorados, e serão.

A todos os amigos da Farmácia Universitária, pela vibração e apoio ao meu doutorado. Minha amiga Bete, obrigada pela amizade de todos esses anos, que foi demonstrada por seu apoio incondicional. À Maria Amélia, agradeço as orações e a força. Ao Carlinhos Guimarães e ao Paulo, obrigada pelos chazinhos que chegavam sempre que eles me viam nervosa ou triste, e pelos momentos de descontração que me proporcionam esses grandes amigos. Agradeço também à Zezé e à Elisandra por todo o carinho e cuidado que me dispensam e pela ajuda na lavagem das vidrarias. Aos amigos João, Gláucia, Náira, Zaida, Márcia, Carla Holandino e Sheila Garcia, agradeço pela amizade de tantos anos que nos fez dividir muitos momentos de alegria e alguns de tristeza. Aos amigos mais

recentes, Eduardo Ricci, Denise, Letícia, Carolina, Adriana, Mariana Villas Boas, Ana Vila, Felipe Gonçalves, Felipe Leal, Maíra, Joçler, Michela, Tatiana, Guilherme, Hermano, Juliana Patrão, Juliana Pires, Dalmo, Vicente e Fortune, agradeço por todas as demonstrações de amizade sincera.

Ao amigo Orcalino da Silva, com quem convivi por mais de trinta e cinco anos. Agradeço seu cuidado e carinho com a aluna Ritinha. Inesquecível sua presença, ao meu lado, no resultado de meu concurso para professor e ainda que foi seu o primeiro abraço que recebi como professora. Saudade das suas brincadeiras e de seus conselhos. Obrigada Orquinha.

Às Professoras Gisela Maria Dellamora Ortiz e Ana Luisa Palhares de Miranda, a todos os Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo apoio.

À Floripes Marinho, por sua pronta ajuda na confecção da ficha catalográfica e nas dúvidas de formatação deste trabalho.

À Professora Guacira Corrêa de Matos e às Coordenadoras de Graduação por suprirem minhas ausências. Obrigada pelo apoio. Esse agradecimento é extensivo a todos os servidores da Secretaria Acadêmica de Graduação.

À Banca Examinadora que gentilmente aceitou o convite para participar desta defesa de tese.

Aos meus Professores Levy Gomes Ferreira, Luis Fernando Secioso Chiavegatto, Maria Yêda Pousa Bacaltchuc, aos professores José Carlos Saraiva Gonçalves e Jorge Fernando Teixeira Soares e aos muitos amigos cultivados em toda Faculdade de Farmácia durante trinta e nove anos.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo e esquecer os caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia; e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Teixeira de Andrade - 1946-2008

RESUMO

BARROS, Rita de Cássia da Silva Ascensão. Desenvolvimento e Avaliação da Eficácia de Novos Sistemas de Liberação Oral de Sildenafil. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O sildenafil é um potente e seletivo inibidor da enzima fosfodiesterase 5, obtido pela empresa Pfizer em 1989, como resultado de pesquisa de novos fármacos para o tratamento da doença arterial coronariana. No início da década de 1990, estudos clínicos demonstraram que o fármaco não apresentou atividade antianginosa promissora, mas que o mesmo induzia à ereção peniana. Assim, em 1998 teve sua aprovação pelo FDA para o tratamento da disfunção erétil (DE). O conhecimento da distribuição da enzima em outros tecidos, como na vasculatura pulmonar, levou à sua aprovação em 2003, como medicamento órfão para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP). Comercialmente, o sildenafil está disponível em comprimidos de 20, 25, 50 e 100 mg, que alcançam a concentração plasmática máxima em cerca de uma hora e apenas cerca de 40% da dose administrada é absorvida. No tratamento da HAP em crianças e idosos, especialmente, se faz necessário o ajuste posológico, que também seria uma maneira de minimizar as reações adversas dose-dependentes do uso do sildenafil na DE. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de soluções orais e sistemas autoemulsionantes de citrato de sildenafil capazes de modular a absorção e a estabilidade do fármaco e permitir ajuste posológico para uso no tratamento da HAP e/ou da DE. Foi obtida uma solução contendo 3,3% de sildenafil em 2-pirrolidona (SSP 3,3%) que se apresentou límpida e incolor sem recristalização do fármaco e foi escolhida para comparação com os sistemas autoemulsionantes de liberação de fármaco (SEDDS) desenvolvidos nesse trabalho. Os SEDDS foram preparados com diferentes misturas de tensoativos: SEDDS 1 (Tween 80®:Span®20), SEDDS 2 (Tween®80:Span®80) contendo 1,3% (SEDDS 1A e SEDDS 2A) e 3,3% de sildenafil (SEDDS 1B e SEDDS 2B), os quais apresentaram-se transparentes, límpidos, com coloração amarela e teor em torno de 95%, determinado por metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência validada. A estabilidade acelerada das formulações foi avaliada e observou-se decaimento do teor de todas as formulações após

90 dias. Os SEDDS foram avaliados em meios de liberação de suco gástrico e suco entérico simulados, mimetizando condições *in vivo*, levando à formação de microemulsões óleo em água com gotículas de tamanho inferior a 300 nm. O ensaio de permeação em intestino isolado de rato mostrou que tanto a solução SSP 3,3% quanto o SEDDS 2B apresentaram perfil de permeação do citrato de sildenafil superior àquele do fármaco disperso diretamente no meio de permeação (PBS), sem diferença estatisticamente significativa entre elas. A toxicidade das formulações foi avaliada em camundongos e demonstrou a segurança do uso dos veículos das formulações placebo de solução SSP e SEDDS. A solução SSP 3,3% e o SEDDS 2B podem ser consideradas alternativas viáveis para, futuramente, serem utilizadas tanto por via oral quanto por via sublingual, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e permitindo o ajuste de dose para os pacientes portadores de HAP ou DE.

Palavras-chave: citrato de sildenafil, 2-pirrolidona, sistemas autoemulsionantes de liberação de fármacos, hipertensão arterial pulmonar, disfunção erétil.

ABSTRACT

BARROS, Rita de Cássia da Silva Ascensão. Development and Efficacy Evaluation of New Sildenafil Oral Delivery Systems. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Sildenafil is a potent and selective inhibitor of phosphodiesterase-5 enzyme, obtained by Pfizer in 1989 as a result of research on new drugs for the treatment of coronary heart disease. In the early 1990s, clinical studies showed that the drug did not present promising antianginal activity, but induced penile erection. Thus, in 1998 it had its approval by the FDA for the treatment of erectile dysfunction (ED). The distribution of the enzyme in other tissues, such as pulmonary vasculature, led to its approval in 2003 as an orphan drug for the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH). Commercially, sildenafil is available in tablets of 20, 25, 50 and 100 mg, reaching maximum plasma concentration within about one hour and only about 40% of the dose is absorbed. For the treatment of PAH especially in children and the elderly dosage adjustment is necessary, which would also be a way to minimize the adverse dose-dependent effects of the use of sildenafil in DE. The aim of this work was the development and characterization of oral solutions and self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of sildenafil citrate capable of modulate the absorption and drug stability and allow dose adjustment for use in the treatment of PAH and/or DE. A 2-pyrrolidone solution was obtained containing 3.3% sildenafil (SSP 3.3%), which appeared clear and colorless without recrystallization of the drug and was chosen for comparison with SEDDS developed in this study. The SEDDS were prepared with different mixtures of surfactants: SEDDS 1 (Tween 80®:Span®20) and SEDDS 2 (Tween®80:Span®80), containing 1.3% (SEDDS 1A and SEDDS 2A) and 3.3% sildenafil (SEDDS 1B and SEDDS 2B), which was transparent, clear, yellow and drug content of about 95%, determined by high performance liquid chromatography validated method. The accelerated stability of the formulations was observed and a decayment of the content of all formulations was observed after 90 days. The SEDDS were evaluated in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, similar to *in vivo* conditions,

leading to the formation of oil in water microemulsions with droplets less than 300 nm size. The permeation test on rat isolated intestine showed that both solution SSP 3.3% and SEDDS 2B presented a sildenafil citrate permeation profile higher than that of sildenafil citrate dispersed directly into the permeation medium (PBS), with no statistically difference between them. The toxicity of the formulations was evaluated in mice and demonstrated the safe use of the SSP solution and SEDDS formulations vehicles. The SSP 3.3% solution and SEDDS 2B can be considered viable alternatives for the future, to be used either orally or sublingually, increasing the bioavailability of the drug and allowing dose adjustment for patients with PAH or ED.

Keywords: sildenafil citrate, 2-pyrrolidone, self-emulsifying drug delivery systems, pulmonary arterial hypertension, erectile dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural do citrato de sildenafil.	24
Figura 2.	Célula endotelial: mecanismo de ação celular do citrato de sildenafil.	26
Figura 3.	Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar.	31
Figura 4.	Segmentos do jejuno canulados em suas extremidades para a realização do ensaio de permeação.	60
Figura 5.	Aparato do ensaio de permeação intestinal.	60
Figura 6.	Câmara de perfusão contendo um segmento intestinal.	61
Figura 7.	Porção intestinal contendo solução de azul de metileno.	61
Figura 8.	Espectro de IV-TF do citrato de sildenafil padrão.	63
Figura 9.	Espectro de IV-TF do citrato de sildenafil amostra.	64
Figura 10.	Termograma do citrato de sildenafil padrão obtido por DSC.	65
Figura 11.	Termograma do citrato de sildenafil amostra obtido por DSC.	65
Figura 12.	Termograma do citrato de sildenafil padrão obtido por TGA.	67
Figura 13.	Termograma do citrato de sildenafil amostra obtido por TGA.	67
Figura 14.	Cromatograma do citrato de sildenafil padrão em fase móvel.	69
Figura 15.	Cromatograma dos SEDDS 1 placebo (a) e SEDDS 1 contendo citrato de sildenafil (b).	69
Figura 16.	Cromatogramas do SEDDS 2 placebo (a) e SEDDS 2 contendo citrato de sildenafil (b).	70
Figura 17.	Cromatogramas da solução placebo (a) e da solução contendo citrato de sildenafil (b).	71
Figura 18.	Curvas analíticas do citrato de sildenafil.	72
Figura 19.	Diagrama pseudoternário de fase do SEDDS 1.	80
Figura 20.	Diagrama pseudoternário de fase do SEDDS 2.	80
Figura 21.	Amostras das formulações desenvolvidas: sistemas autoemulsionantes (SEDDS 1 e SEDDS 2) e solução em 2-pirrolidona.	84
Figura 22.	Permeação de citrato de sildenafil nas diferentes formulações em intestino isolado de rato.	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação clínica atualizada da hipertensão arterial pulmonar.	30
Quadro 2.	Principais causas orgânicas e fatores psicogênicos relacionados com a disfunção erétil.	38
Quadro 3.	Classificação dos sistemas lipídicos.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Formulações utilizadas na avaliação da toxicidade.	62
Tabela 2.	Análise de regressão linear das curvas analíticas.	73
Tabela 3.	Determinação da precisão intra-dia e inter-dia do método analítico.	74
Tabela 4.	Resultados da porcentagem de recuperação para análise da exatidão do método analítico.	75
Tabela 5.	Resultados da análise de robustez do método analítico.	76
Tabela 6.	Correlação da dosagem usual de citrato de sildenafil com a quantidade de gotas das soluções propostas.	77
Tabela 7.	Composição das soluções de citrato de sildenafil preparadas.	77
Tabela 8.	Caracterização da solução de sildenafil a 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%).	79
Tabela 9.	Composição dos sistemas autoemulsionantes SEDDS 1 e SEDDS 2.	81
Tabela 10.	Resultados da caracterização dos SEDDS.	83
Tabela 11.	Estudo de estabilidade da solução de sildenafil.	85
Tabela 12.	Avaliação da condutividade dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.	86
Tabela 13.	Avaliação do índice de refração dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.	87
Tabela 14.	Avaliação do teor dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.	88
Tabela 15.	Avaliação do comportamento dos SEDDS nos meios de liberação.	89
Tabela 16.	Determinação da área sob a curva no ensaio de permeação.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Emulsão do tipo água em óleo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BMPR2	Receptores de proteína morfogenética óssea do tipo 2
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cmax	Concentração plasmática máxima
DL50	Dose letal média
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPVO	Doença pulmonar veno-oclusiva
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EMEA	European Medicines Agency
ETA	Receptor de endotelina do tipo A
ETB	Receptor de endotelina do tipo B
Fc	Fator de correção
FDA	Food and Drug Administration
FGFb	Fator de crescimento do fibroblasto básico
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPTC	Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica

IC	Inclinação da curva de calibração
IP	Índice de polidispersividade
IV-TF	Infravermelho por transformada de fourier
LabCQ	Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia
LabTIF-UFRJ	Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Universidade Federal do Rio de Janeiro
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NIH	National Institutes of Health
N/A	Não se aplica
N/D	Não determinado
O/A	Emulsão do tipo óleo em água
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffer solution
PDE-5	Enzima fosfodiesterase do tipo 5
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
RE	Resolução
RPM	Rotação por minuto
RVP	Resistência vascular pulmonar
SEDDS	Self-emulsifying drug delivery systems
SES	Suco entérico simulado
SGS	Suco gástrico simulado
SMEDDS	Self-microemulsifying drug delivery systems
SNEDDS	Self-nanoemulsifying drug delivery systems

SSP	Solução de citrato de sildenafil em 2-pirrolidona
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
TGA	Análise Termogravimétrica
TGF	Fator de transformação de crescimento alfa e beta
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta

LISTA DE FÓRMULAS E SÍMBOLOS

mg	Miligrama
ml	Mililitro
%	Porcentagem
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	Minuto
l	Litro
µm	Micrômetro
KBr	Brometo de potássio
cm	Centímetro
T	Transmitância
°C	Grau Celsius
mm	Milímetro
M	Molar
nm	Nanômetro
µl	Microlitro
r	Coefficiente de correlação
g	Gramma
µS	Microsiemens
NaCl	Cloreto de sódio
N	Normal
R ²	Coefficiente de Determinação
m/v	Massa por volume
kg	Quilograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 SILDENAFILA	24
1.1.1 Histórico e Apresentação	24
1.1.2 Mecanismo de ação	25
1.1.3 Farmacocinética	27
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	28
1.2.1 Definição e Classificação	28
1.2.2 Fisiopatologia	31
1.2.3 Tratamento	33
1.3 DISFUNÇÃO ERÉTIL	36
1.3.1 Definição	36
1.3.2 Fisiopatologia	37
1.3.3 Tratamento	39
1.4 SISTEMAS LÍQUIDOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	41
1.5 JUSTIFICATIVA	44
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 MATERIAL	46
3.1.1 Solventes, Reagentes, Matérias-primas	46
3.1.2 Equipamentos	47
3.2 MÉTODOS	48
3.2.1 Análise de Identificação do Citrato de Sildenafil	48
3.2.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF)	48

3.2.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)	48
3.2.2 Validação de Metodologia Analítica para Quantificação de Citrato de Sildenafil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	49
3.2.2.1 Condições Cromatográficas e Preparo de Soluções	49
3.2.2.2 Especificidade e Seletividade	50
3.2.2.3 Linearidade	50
3.2.2.4 Precisão	51
3.2.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	51
3.2.2.6 Exatidão	52
3.2.2.7 Robustez	52
3.2.2.8 Preparo ds Amostras	52
3.2.3 Preparo e Caracterização das Formulações	53
3.2.3.1 Preparo das Soluções	53
3.2.3.2 Caracterização das Soluções	54
3.2.3.2.1 Determinação do Teor	54
3.2.3.2.2 Determinação de pH	54
3.2.3.2.3 Avaliação do Aspecto Visual	54
3.2.3.3 Preparo dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)	54
3.2.3.3.1 Construção do Diagrama Pseudoternário de Fases	55
3.2.3.4 Caracterização dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)	56
3.2.3.4.1 Determinação do Teor	56
3.2.3.4.2 Determinação da Viscosidade	56
3.2.3.4.3 Determinação da Condutividade	56
3.2.3.4.4 Determinação do Índice de Refração	57
3.2.3.4.5 Avaliação do Aspecto Visual	57
3.2.4 Estudo de Estabilidade	57

3.2.4.1 Estudo de Estabilidade da Solução	58
3.2.4.2 Estudo de Estabilidade dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)	58
3.2.5 Avaliação do Comportamento dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos nos Meios de Liberação	58
3.2.6 Ensaio de Permeação em Intestino Isolado de Rato	59
3.2.7 Avaliação da Toxicidade das Formulações	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DO CITRATO DE SILDENAFILA	63
4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF)	63
4.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)	65
4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITRATO DE SILDENAFILA POR CLAE	68
4.2.1 Especificidade e Seletividade	68
4.2.2 Linearidade	72
4.2.3 Precisão	74
4.2.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	75
4.2.5 Exatidão	75
4.2.6 Robustez	76
4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	77
4.3.1 Preparo e Caracterização das Soluções	77
4.3.2 Preparo e Caracterização dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármaco (SEDDS)	79
4.3.2.1 Construção do Diagrama Pseudoternário de Fases	79
4.3.2.2 Preparo dos SEDDS	81
4.3.2.3 Caracterização dos SEDDS	83
4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE	85
4.4.1 Estudo de Estabilidade da Solução	85

4.4.2 Estudo de Estabilidade dos SEDDS	86
4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS SEDDS NOS MEIOS DE LIBERAÇÃO	88
4.6 ENSAIO DE PERMEAÇÃO EM INTESTINO ISOLADO DE RATO	90
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES	92
5 CONCLUSÃO	94
6 PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 SILDENAFILA

1.1.1 Histórico e Apresentação

O sildenafil é um inibidor de fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), altamente seletivo, descoberto em 1989, durante pesquisa de novos agentes químicos potencialmente úteis no tratamento da doença arterial coronariana. Os primeiros estudos clínicos realizados no início da década de 1990 já demonstraram que o fármaco não apresentava atividade antianginosa promissora, no entanto, resultaram na descoberta acidental de que o mesmo induzia à ereção peniana e na sua posterior aprovação para o tratamento da disfunção erétil (DE) (RAJA; NAYAK, 2004). A identificação da distribuição da enzima PDE5 em outros tecidos entusiasmou muitos farmacologistas e médicos, que definiram novas indicações para o uso do sildenafil, o qual passou a ser empregado também no tratamento de diversas formas da hipertensão pulmonar (RAJA *et al.*, 2006).

O produto comercial foi desenvolvido na forma de um sal, o citrato de sildenafil (Figura 1), com o objetivo de aumentar a solubilidade do fármaco (JUNG *et al.*, 2011).

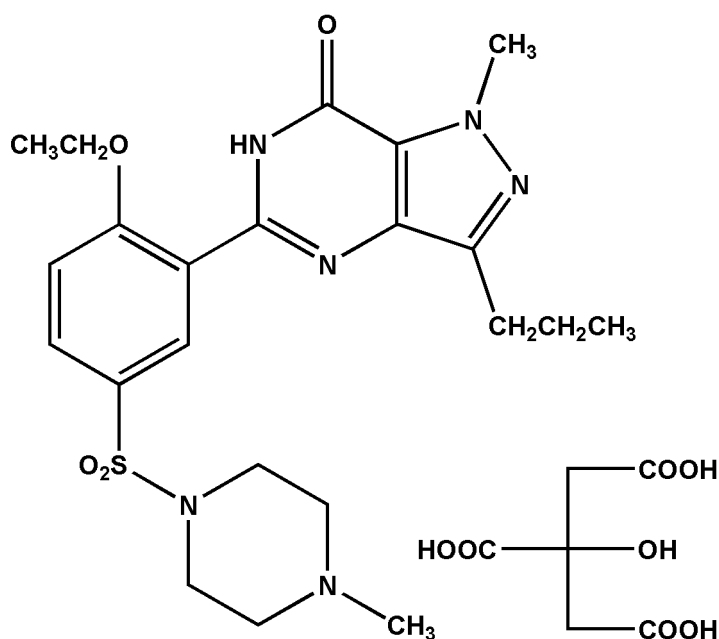


Figura 1. Fórmula estrutural do citrato de sildenafil.

Assim, em 1998, o citrato de sildenafil (Viagra[®], Pfizer) foi aprovado para o tratamento da disfunção erétil nos Estados Unidos da América e na Europa, sendo o primeiro inibidor de PDE5 licenciado para essa indicação (GIULIANO *et al.*, 2010). Mais tarde, em 2005, também foi aprovado para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) (Revatio[®], Pfizer) (RAMANI; PARK, 2010).

Ambos os medicamentos foram aprovados inicialmente na forma farmacêutica de comprimidos revestidos de 25, 50 e 100 mg, no caso do Viagra[®], e de 20 mg, no caso do Revatio[®]. Mais tarde, novas formas farmacêuticas foram aprovadas para o tratamento da HAP tanto nos Estados Unidos da América quanto em países da Europa: em 2009, o Revatio[®] foi disponibilizado na forma injetável (10 mg / 12,5 ml, equivalente a dose oral de 20 mg), com administração em bolus, três vezes ao dia, e em 2012, na forma de suspensão oral extemporânea (10 mg/ml), cujo conteúdo de 2 ml de uma seringa oral é bioequivalente ao comprimido de 20 mg (FDA, 2009; FDA, 2012; EMEA, 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou o uso de citrato de sildenafil para o tratamento da disfunção erétil em 1998 e para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar em 2006; mas, em ambos os casos, a aprovação foi feita para maiores de 18 anos. E tanto o Viagra[®] quanto o Revatio[®] estão disponíveis apenas na forma farmacêutica de comprimidos para o tratamento dos pacientes com HAP e com disfunção erétil (SOUZA; CABRAL; HUF, 2009).

1.1.2 Mecanismo de ação

O sildenafil pertence a uma classe de compostos denominada inibidores de fosfodiesterase. As fosfodiesterases participam de uma grande família de enzimas que hidrolisam os nucleotídeos cíclicos adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e guanosina monofosfato cíclico (GMPC) e, portanto, exercem papel fundamental na modulação de vias de sinalização por segundo mensageiro (RAJA; NAYAK, 2004). Pelo menos 11 isoformas de fosfodiesterases já foram descobertas, as quais variam em termos de seletividade de substrato, localização nos tecidos e mecanismo de ação (RAMANI; PARK, 2010). A distribuição diferencial dessas isoformas pelos vários tecidos e a seletividade dos agentes farmacológicos inibidores dessas enzimas são a base para os potenciais efeitos tecido-específicos dos inibidores de fosfodiesterases (RAJA; NAYAK, 2004).

A PDE5 é um dos membros dessa superfamília e cliva especificamente o GMPc, um importante segundo mensageiro intracelular; foi inicialmente identificada nos pulmões, no músculo liso vascular e nas plaquetas (RAJA *et al.*, 2006). A presença predominante dessa isoforma nos corpos cavernosos (BOOLELL *et al.*, 1996) e no tecido pulmonar (AHN *et al.*, 1991 apud GHOFrani *et al.*, 2003) justificam a utilização do sildenafil, um potente e competitivo inibidor seletivo da PDE5, no tratamento da disfunção erétil e da HAP (BOOLELL *et al.*, 1996; RAJA; NAYAK, 2004; RAJA *et al.*, 2006).

Os efeitos do sildenafil tanto no tratamento da disfunção erétil como no tratamento da HAP estão relacionados aos efeitos de vasodilatação mediados pelo óxido nítrico. A nível celular, o óxido nítrico estimula a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc, o qual apresenta diversos efeitos fisiológicos nas células, mediados pela ativação de proteínas quinases, regulação dos canais iônicos e alteração das concentrações intracelulares de nucleotídeos cíclicos (RAMANI; PARK, 2010). Ao inibir a PDE5, o sildenafil aumenta as concentrações intracelulares de GMPc, causando a amplificação da via de sinalização óxido nítrico-GMPc (HATZIMOURATIDIS, 2006), ou seja, impede a hidrólise do GMPc, prolongando sua ação, que resulta no aumento do relaxamento do músculo liso e vasodilatação (RAJA *et al.*, 2006), conforme apresentado na Figura 2.

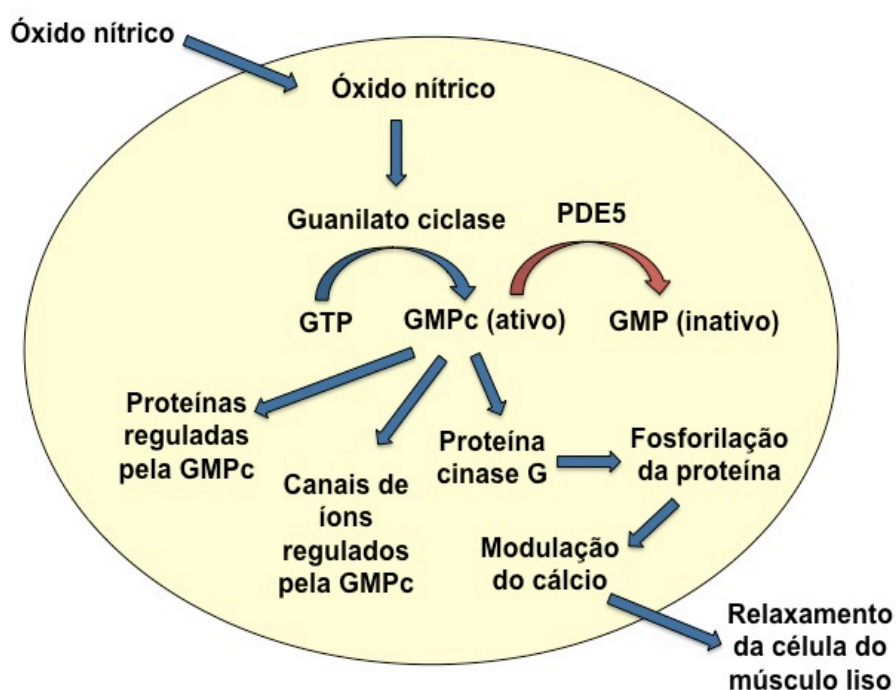


Figura 2. Célula endotelial: mecanismo de ação celular do citrato de sildenafil (Adaptado de EARDLEY, 2010; RAMANI; PARK, 2010).

A HAP está associada a níveis muito baixos de óxido nítrico no endotélio pulmonar, em parte por causa da expressão reduzida de síntese de óxido nítrico na microvasculatura pulmonar. Dessa forma, o uso do sildenafil no tratamento dessa condição manteria os efeitos benéficos vasodilatadores do óxido nítrico, uma vez que os mesmos são reconhecidamente interessantes para o tratamento de doenças vasculares (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011).

No tratamento da disfunção erétil, por sua vez, o uso do sildenafil potencializaria os efeitos pró-ereção do GMPc. Com a estimulação sexual, o óxido nítrico é liberado para os corpos cavernosos e estimula a produção de GMPc, seguindo o mecanismo anteriormente descrito e promovendo a ereção. No caso de uma disfunção, a inibição da PDE5 e o conseqüente aumento de GMPc resultariam no relaxamento do músculo liso e, assim, haveria o aumento do influxo arterial, a expansão dos corpos cavernosos e a redução do fluxo venoso da região (EARDLEY, 2010).

1.1.3 Farmacocinética

Em estudo para a avaliação da farmacocinética do citrato de sildenafil, verificou-se que: após administração oral de uma única dose, o sildenafil é absorvido alcançando a concentração máxima no plasma em aproximadamente uma hora; as concentrações plasmáticas de sildenafil observadas no estudo foram geralmente proporcionais à dose administrada; a presença de alimento retardou o fluxo de absorção, mas afetou minimamente a extensão de fármaco absorvido; a biodisponibilidade foi de 41% devido ao efeito de primeira passagem; o fármaco foi rapidamente eliminado do organismo com tempo de meia-vida de eliminação plasmática de aproximadamente três a quatro horas na faixa de dose de 25 e 200 mg (NICHOLS; MUIRHEAD; HARNESS, 2002).

Outras informações relevantes sobre a farmacocinética do sildenafil foram relatadas em estudos de revisão recentes: o sildenafil apresenta volume de distribuição aparente de 105 litros (em indivíduo de 70 quilos) e liga-se extensivamente às proteínas plasmáticas; a principal via de metabolização do sildenafil é o metabolismo hepático pelas enzimas do citocromo P450, principalmente pela CYP3A4 e, em menor extensão, pela CYP2C9, e essa via enzimática é responsável pelas principais interações medicamentosas associadas ao uso do sildenafil; seu principal metabólito é o N-desmetilsildenafil, um metabólito ativo que mantém a especificidade pela PDE5, sendo

responsável por aproximadamente 40% da concentração de sildenafil no plasma e por 20% da atividade farmacológica do mesmo; aproximadamente 80% do fármaco é eliminado nas fezes e 13% por excreção renal; indivíduos com comprometimento da função renal apresentam depuração renal significativamente reduzida e as concentrações plasmáticas de sildenafil estão aumentadas em pacientes com comprometimento hepático, disfunção renal severa, em idosos e com o uso concomitante de inibidores de citocromo P450 (RAJA *et al.*, 2006; RAMANI; PARK, 2010).

1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

1.2.1 Definição e Classificação

Hipertensão pulmonar é uma doença progressiva, proveniente de diversas origens, associada a um diagnóstico difícil e que resulta na disfunção do ventrículo direito. Estima-se que todas as apresentações da doença afetem até 100 milhões de pessoas em todo o mundo (SIMONNEAU *et al.*, 2009; SCHERMULY *et al.*, 2011).

Por se tratar de uma doença complexa, a hipertensão pulmonar apresenta uma classificação clínica cujo objetivo é agrupar as suas diferentes manifestações de acordo com as similaridades nos mecanismos fisiopatológicos, apresentação clínica e abordagens terapêuticas (SIMONNEAU *et al.*, 2009).

Inicialmente, foram apresentadas apenas duas categorias para classificar a hipertensão pulmonar: hipertensão pulmonar primária e hipertensão pulmonar secundária, de acordo com a presença ou a ausência de fatores de risco ou causas identificáveis. Em 1998 e em 2003, duas novas classificações foram sugeridas, considerando as condições clínicas da doença e dividindo a mesma em cinco categorias, de acordo com características patológicas, fisiopatológicas e terapêuticas da doença. Essa nova classificação permitiu que investigadores conduzissem ensaios clínicos com grupos de pacientes mais bem definidos, resultando na aprovação de novos medicamentos para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) em todo o mundo (SIMONNEAU *et al.*, 2009).

Desde a primeira classificação, proposta em 1973, durante simpósio organizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a HAP, uma das cinco categorias da hipertensão pulmonar, tem sido o foco dessa patologia (SIMONNEAU *et al.*, 2009).

A HAP é uma doença complexa, de progressão rápida e que não apresenta cura (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011). É uma síndrome resultante do fluxo reduzido na circulação arterial pulmonar e é caracterizada pela remodelagem progressiva da vasculatura pulmonar, que leva ao aumento da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar e, geralmente, culmina com a insuficiência cardíaca direita (McLAUGHLIN *et al.*, 2009; RAMANI; PARK, 2010).

A definição hemodinâmica da HAP é um aumento na pressão arterial pulmonar média maior do que 25 mmHg, uma pressão capilar pulmonar, pressão atrial esquerda ou pressão ventricular esquerda diastólica final menor ou igual a 15 mmHg e uma resistência vascular pulmonar (RVP) maior do que 3 mmHg.min/l, conforme consenso da Sociedade Americana de Cardiologia (McLAUGHLIN *et al.*, 2009).

De acordo com a classificação atualmente aceita da hipertensão pulmonar (Quadro 1), definida durante um simpósio mundial ocorrido em Dana Point, na Califórnia, no ano de 2008, a HAP pode ser idiopática ou pode ocorrer em diferentes condições clínicas associadas a algumas doenças do tecido conjuntivo, à infecção pelo vírus HIV, à hipertensão portal, às cardiopatias congênitas, à esquistossomose e anemia hemolítica crônica, ou ainda pode ser resultado de fatores de risco ou condições que predispõem o seu surgimento, como medicamentos e toxinas (SIMMONEAU *et al.*, 2009; SCHERMULY *et al.*, 2011).

Quadro 1. Classificação clínica atualizada da hipertensão pulmonar (Adaptado de SIMONNEAU *et al.*, 2009).

Classificação Clínica Atualizada de Hipertensão Pulmonar (Dana Point, 2008)
<p>1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)</p> <p>1.1 HAP Idiopática</p> <p>1.2 HAP Hereditária</p> <p>1.2.1 HAP relacionada à alteração no gene <i>BMPR2</i> (<i>receptor tipo 2 da proteína morfogenética do osso</i>)</p> <p>1.2.2 HAP relacionada à alteração no gene <i>ALK-1</i> (<i>receptor ativina semelhante à quinase tipo 1</i>) e <i>endogлина</i> (<i>com ou sem teleangiectasia hemorrágica hereditária</i>)</p> <p>1.2.3 Desconhecida</p> <p>1.3 HAP induzida por medicamentos e toxinas</p> <p>1.4 HAP associada a:</p> <p>1.4.1 Doenças do tecido conjuntivo</p> <p>1.4.2 Infecção por HIV</p> <p>1.4.3 Hipertensão portal</p> <p>1.4.4 Doença cardíaca congênita</p> <p>1.4.5 Esquistossomose</p> <p>1.4.6 Anemia hemolítica crônica</p> <p>1.5 Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido</p>
<p>1'. Doença pulmonar veno-oclusiva (DPVO) e/ou hemangiomatose capilar pulmonar</p>
<p>2. Hipertensão pulmonar devido a doenças do coração esquerdo</p> <p>2.1 Disfunção sistólica</p> <p>2.2 Disfunção diastólica</p> <p>2.3 Doença valvular</p>
<p>3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia</p> <p>3.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica</p> <p>3.2 Doença pulmonar intersticial</p> <p>3.3 Outras doenças pulmonares com modelo restritivo e obstrutivo misto</p> <p>3.4 Respiração com distúrbios do sono</p> <p>3.5 Distúrbios de hipoventilação alveolar</p> <p>3.6 Exposição crônica à altitude</p> <p>3.7 Anormalidades de desenvolvimento</p>
<p>4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (HPTC)</p>
<p>5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais não esclarecidos</p> <p>5.1 Desordens hematológicas: desordens mieloproliferativas, esplenectomia</p> <p>5.2 Desordens sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar de células de Langerhans, linfangioleiomiomatose, neurofibromatose, vasculite</p> <p>5.3 Desordens metabólicas: doença de armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, distúrbios da tireóide</p> <p>5.4 Outros: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica em diálise</p>

1.2.2 Fisiopatologia

A circulação pulmonar é normalmente caracterizada pela pressão e resistência vasculares baixas, em que as artérias pulmonares dilatam e contraem para controlar a resistência vascular pulmonar. Na HAP, existe uma elevação persistente da pressão e da resistência pulmonares, levando a mudanças na artéria vascular pulmonar, incluindo vasoconstrição crônica, hipertrofia do músculo liso e proliferação celular, seguida de obstrução da parede vascular pulmonar, inflamação e trombose (GALIE *et al.*, 2009; CENTENO, 2011). Embora as subcategorias da HAP difiram nas suas causas, todas são caracterizadas por essa vasoconstrição excessiva e remodelagem vascular anormal, processos que afetam todas as camadas dos vasos: íntima, média e adventícia, resultando na perda severa de área do corte transversal do vaso, o que leva à sobrecarga, hipertrofia e dilatação e, eventualmente, falência do ventrículo direito, seguida de morte (GALIE *et al.*, 2009; TUDER *et al.*, 2009).

A fisiopatologia da HAP é complexa e multifatorial, com mecanismos que envolvem diversas vias bioquímicas e tipos celulares (GALIE *et al.*, 2009). Os principais mecanismos celulares e moleculares de obstrução do vaso e indução da doença estão apresentados na Figura 3 e serão descritos a seguir.

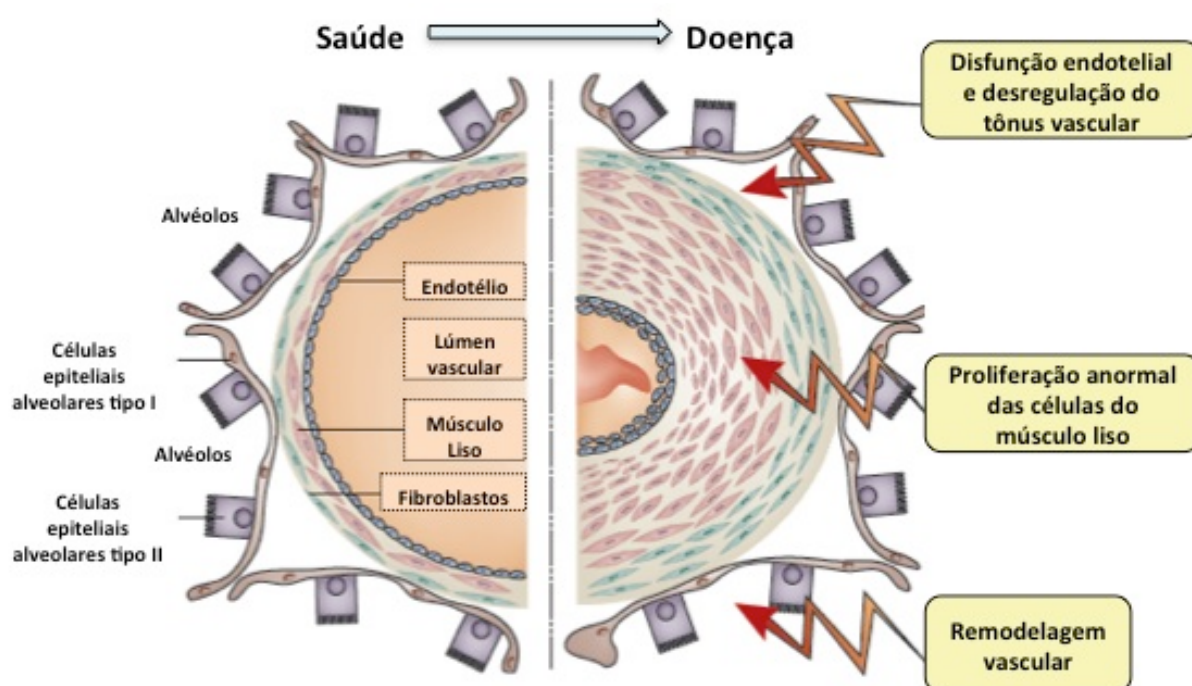


Figura 3. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar (Adaptado de SCHERMULY *et al.*, 2011).

As alterações histológicas comumente observadas na vasculatura de pacientes com HAP são a hipertrofia da camada íntima, com injúria endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da camada íntima por fibroblastos, aumento da deposição da matriz e conseqüente fibrose dessa camada, hipertrofia do músculo liso e vasoconstrição e proliferação da camada adventícia com trombose *in situ*. Com o tempo, essas mudanças levam à obstrução do fluxo vascular, resultando em angiogênese desorganizada e formação de arteriopatia plexiforme (SCHERMULY *et al.*, 2011; McLAUGHLIN; DAVIS; CORNWELL, 2011).

A desregulação do tônus vascular, caracterizada pela vasoconstrição excessiva, tem sido relacionada ao desequilíbrio dos mediadores vasoativos. Na HAP, observa-se a expressão ou função anormal dos canais de cálcio e potássio nas células do músculo liso, desregulando a homeostase celular e induzindo seqüelas fibroproliferativas nas células do músculo liso vascular; observa-se também a disfunção endotelial, que prejudica a produção de agentes vasodilatadores e antiproliferativos, como óxido nítrico e prostaciclina, e leva ao aumento da expressão de substâncias vasoconstritoras e proliferativas, como tromboxano A₂, endotelina-1 e 5-hidroxitriptamina ou serotonina (GALIE *et al.*, 2009; CENTENO, 2011; SCHERMULY *et al.*, 2011). Essas alterações são comumente observadas em pacientes com HAP, que apresentam níveis reduzidos de prostaglandina I₂ (PGI₂), de óxido nítrico e do segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica, ao passo que apresentam níveis aumentados de tromboxano e endotelina-1 (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011; SCHERMULY *et al.*, 2011).

A proliferação celular e a remodelagem vascular anormais observadas na fisiopatologia da HAP também estão relacionadas com diversos mediadores químicos: alguns vasoconstritores, como a endotelina-1 e a serotonina, apresentam ação pró-proliferativa e estimulam a proliferação de células do músculo liso; fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento do fibroblasto básico (FGFb) e o fator de transformação de crescimento alfa e beta (TGF), estão envolvidos na remodelagem vascular; proteases e elastases, como a metaloproteinases de matriz, modulam as proteínas estruturais da matriz extracelular; receptores de proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP2), fatores de transcrição, receptores gama proliferativos ativado de peroxissoma, citocinas e quimiocinas inflamatórias estão envolvidos nos processos de crescimento e proliferação

de células endoteliais e do músculo liso vascular, de inflamação e de angiogênese, característicos da doença (SCHERMULY *et al.*, 2011).

Os avanços no conhecimento da fisiopatologia da HAP têm contribuído para a evolução do tratamento da doença, uma vez que têm possibilitado o desenvolvimento de novos fármacos que atuam nos diferentes desarranjos dos processos fisiopatológicos da doença (McLAUGHLIN *et al.*, 2009; McLAUGHLIN; DAVIS; CORNWELL, 2011; SCHERMULY *et al.*, 2011).

1.2.3 Tratamento

As manifestações clínicas comumente observadas na HAP são sintomas como dispnéia no esforço, fadiga, falta de energia, dor no peito, síncope, palpitações e edema nas extremidades baixas. Esses sintomas são não-específicos, o que dificulta o diagnóstico, e só costumam aparecer após a resistência vascular pulmonar estar significativamente elevada, tornando-a um fator importante para evitar os atrasos no diagnóstico da doença. Quando há a suspeita de HAP, diversos exames como raios-x, eletrocardiograma, tomografia computadorizada, entre outros, são utilizados para definição do diagnóstico, seguindo algoritmo publicado em consenso americano (McLAUGHLIN; DAVIS; CORNWELL, 2011).

O tratamento da HAP, quando diagnosticada, baseou-se, durante muito tempo, apenas no controle dos sintomas, o que incluía o manejo da falência do ventrículo direito com diuréticos e digoxina, terapia com oxigênio suplementar para corrigir a hipoxemia e o uso controlado de bloqueadores de canais de cálcio (RAMANI; PARK, 2010). Porém, nos últimos 25 anos, a HAP tem se transformado de uma doença que era praticamente fatal devido à falta de estratégias de tratamento, para uma doença com algumas opções terapêuticas disponíveis (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011).

Os principais objetivos do tratamento do paciente com HAP são: melhora dos sintomas, como dispnéia; aumento da capacidade funcional; diminuição da pressão arterial pulmonar e normalização do débito cardíaco; prevenção ou reversão do progresso da doença, evitando que sejam necessários mais medicamentos, hospitalização e transplante pulmonar (McLAUGHLIN *et al.*, 2009).

O reconhecimento de que a progressão da doença é caracterizada pela remodelagem vascular e por um desequilíbrio entre os mediadores proliferativos e anti-

inflamatórios resultou na identificação da importância da prostaciclina, da endotelina e do óxido nítrico na inicialização e na progressão da doença, de modo que essas principais vias servem como alvo para modalidades de tratamento específicas que revolucionaram o manejo da HAP, melhorando a capacidade funcional, a hemodinâmica e o bem estar do paciente (RAMANI & PARK, 2010).

Portanto, pode-se considerar que o tratamento da HAP baseia-se em três pilares fundamentais: via das prostaciclina, via da endotelina e via do óxido nítrico; embora diversos medicamentos que atuam nessas três vias estejam atualmente disponíveis aos pacientes, ainda não existe a cura para a doença (BALOIRA, 2009; BROTO; TORRES, 2009).

Os prostanóides são uma família de análogos estáveis da prostaciclina (ou PGI₂) e estão disponíveis em várias formulações desenvolvidas para o tratamento da HAP, a saber: (1) epoprostenol, sal sódico sintético da PGI₂ natural, que foi o primeiro prostanóide a ser testado em pacientes com HAP; possui tempo de meia-vida inferior a 5 minutos, e por isso tem a desvantagem de requerer o uso de bomba de infusão e cateter venoso central para administração intravenosa contínua, além de monitoramento contínuo devido ao seu perfil de segurança e possibilidade de infecções relacionadas ao cateter; (2) treprostinil sal sódico, análogo da PGI₂ com melhor estabilidade e maior tempo de meia vida (aproximadamente 4 horas) do que o epoprostenol; pode ser administrado por via subcutânea, intravenosa, inalatória ou oral e a principal limitação do seu uso é a dor no local da infusão e a falta de evidências de que a terapia com treprostinil melhora a sobrevivência dos pacientes com HAP; (3) beraprost sal sódico, prostanóide ativo oralmente, que demonstrou eficácia modesta em pacientes com HAP; está disponível apenas no Japão e na Coreia do Sul; (4) iloprost, análogo estável de prostaciclina desenvolvida para administração por inalação ou via intravenosa; os efeitos vasodilatadores no pulmão duram aproximadamente de 30 a 45 minutos e múltiplas nebulizações diárias de até 15 minutos cada são necessárias para a eficácia do tratamento (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011).

A endotelina 1, ao se ligar aos receptores ETA e ETB nas células do músculo liso arterial pulmonar promove vasoconstrição, enquanto que a ativação dos receptores ETB nas células endoteliais causa vasodilatação pelo aumento dos níveis de prostaciclina e óxido nítrico. Os antagonistas dos receptores de endotelina disponíveis são: (1) bosentana, que liga-se e bloqueia de forma irreversível os subtipos de receptores de

endotelina 1; seu principal efeito adverso é a toxicidade hepática, que implica na necessidade de monitoramento mensal das enzimas hepáticas transaminases e na redução da dose ou descontinuação do tratamento em casos de resultados acima do limite; (2) ambrisentana, antagonista altamente seletivo do receptor ETA, administrado por via oral uma vez ao dia; (3) sitaxentana, antagonista seletivo do receptor ETA, que foi retirado do mercado após relatos de mortes atribuídas à falência aguda do fígado com o uso do medicamento (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011).

O óxido nítrico, por sua vez, é um potente relaxante das células do músculo liso arterial pulmonar e exerce atividade vasodilatadora pela regulação do metabolismo de GMPc, o qual é dependente da ativação de fosfodiesterases, das quais a PDE5 é a de expressão mais abundante na circulação pulmonar. Os inibidores de fosfodiesterase 5 surgiram como uma importante classe terapêutica, cuja estratégia é limitar o metabolismo de GMPc, mantendo os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico, que são de interesse para o tratamento da HAP (O'CALLAGHAN *et al.*, 2011). Os principais inibidores de fosfodiesterase 5, atualmente clinicamente disponíveis para o tratamento da HAP são o sildenafil e o tadalafila; ambos são altamente potentes e ativos por via oral e diferem principalmente em sua farmacocinética, de modo que o sildenafil atinge a concentração plasmática máxima em menos tempo do que o tadalafila, que por sua vez possui um tempo de meia vida mais prolongado do que o sildenafil (EARDLEY, 2010).

De acordo com a bula do medicamento de referência do citrato de sildenafil (Revatio®), para o tratamento da HAP, a dose recomendada é de 20 mg, três vezes ao dia, nos casos das apresentações em comprimido e suspensão oral, e de 10 mg, também três vezes ao dia, no caso da solução injetável endovenosa (FDA, 2012b). Tanto a suspensão oral quanto a injeção são novas formas de administração do medicamento, disponíveis apenas nos Estados Unidos da América e na União Européia, que contribuem para atender às necessidades de pacientes que, por exemplo, tenham dificuldades na administração dos comprimidos, como é o caso dos pacientes pediátricos, ou que estejam temporariamente impossibilitados de administrar o medicamento por via oral. Além disso, uma grande vantagem dessas novas formas farmacêuticas líquidas, ainda não disponíveis no Brasil e já vislumbradas pelo nosso grupo em trabalhos anteriores (DE PAULA, 2010; SOUZA; CABRAL; HUF, 2009), é a possibilidade do ajuste posológico, especialmente para pacientes pediátricos, idosos, ou com comprometimentos renal, hepático ou cardíaco, por exemplo.

O uso do sildenafil em crianças está aprovado apenas na Europa (EMEA, 2012). No entanto, alguns estudos têm mostrado a eficácia do sildenafil no tratamento da HAP em crianças e recém-nascidos (RAPOSO-SONNENFELD et al., 2007; BAQUERO, 2009; NEMOTO, 2010) e o mesmo tem sido utilizado em hospitais no Brasil, apesar das dificuldades do uso dos comprimidos, que muitas vezes precisam ser partidos para o ajuste de dose e/ou usados em preparações extemporâneas, líquidas, para serem administrados, resultando em possíveis erros de dosagens e falta de estabilidade das formulações (SOUZA; CABRAL; HUF, 2009).

Para pacientes idosos, a seleção da dose também deve ser feita com cuidado, devido à frequência de comprometimento hepático, renal ou cardíaco e às doenças concomitantes e seus tratamentos. De acordo com os resultados de estudos clínicos descritos na bula do medicamento, voluntários idosos saudáveis apresentaram *clearance* reduzido do sildenafil, com concentrações plasmáticas de sildenafil e de seu metabólito (N-desmetil-sildenafil) maiores do que quando comparado a voluntários saudáveis mais jovens. No caso de voluntários com comprometimento renal severo ou com comprometimento hepático leve a moderado, o *clearance* de sildenafil também foi reduzido, resultando em aumento significativo da área sob a curva (AUC) e da concentração plasmática máxima (C_{max}) do sildenafil e de seu metabólito (FDA, 2012b).

A demanda por uma forma farmacêutica que permita o ajuste posológico do sildenafil incita o desenvolvimento de novos sistemas de liberação oral, que podem contribuir com uma modificação no perfil farmacocinético do fármaco e, aliado ao ajuste posológico, permitir uma individualização do tratamento, minimizando os riscos e efeitos adversos do uso dos medicamentos atualmente disponíveis.

1.3 DISFUNÇÃO ERÉTIL

1.3.1 Definição

De acordo com o consenso do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health - NIH*), estabelecido durante conferência sobre impotência realizada em dezembro de 1992, a impotência pode ser definida como a “disfunção erétil

masculina, ou seja, a incapacidade de obter ou manter uma ereção suficiente para um desempenho sexual satisfatório” (WILLIAMS; MELMAN, 2012).

A disfunção erétil afeta aproximadamente 152 milhões de homens em todo o mundo e existe uma estimativa de que se atinja 322 milhões de casos da doença no ano de 2025; claramente, pode-se observar que essa prevalência tende a aumentar com a idade e que o aumento da população mais velha sadia tem tornado a disfunção erétil um problema de saúde em todo o mundo (McKINLAY, 2000 apud WILLIAMS; MELMAN, 2012; SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

Embora a disfunção erétil não seja uma doença associada a risco de vida, essa desordem afeta negativamente a qualidade de vida do paciente e pode levar à baixa autoestima, depressão e ansiedade (LEE, 2011). Além disso, a disfunção erétil também pode ter impacto significativo na saúde física e psicológica do homem e de seus parceiros, conforme evidenciado pelo volume de publicações sobre o assunto (TSERTSVADZE *et al.*, 2009; CHUNG; BROCK, 2011; SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

O desenvolvimento da disfunção erétil é frequentemente atribuído tanto a fatores psicogênicos quanto a alterações fisiológicas das funções neural, vascular, hormonal e endotelial (CHUNG; BROCK, 2011). Trata-se de uma desordem cujos fatores de risco são comuns à doença cardiovascular, diabetes mellitus, hiperlipidemia, hipertensão, depressão, fumo, obesidade e doença arterial (WILLIAMS; MELMAN, 2012; SHAMLOUL; GHANEM, 2013). Recentemente, alguns estudos epidemiológicos relataram que a disfunção erétil seria um marcador de doença cardiovascular; a disfunção erétil apresenta prevalência significativamente maior em pacientes com hipertensão e foi associada à ocorrência de eventos adversos cardiovasculares em pacientes com alto risco de desenvolverem a doença (SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

1.3.2 Fisiopatologia

A função sexual normal tem sido descrita como um processo biopsicossocial que envolve a coordenação dos sistemas psicológico, endócrino, vascular e neurológico. A disfunção erétil, portanto, pode ser classificada como psicogênica, orgânica ou como uma mistura psicogênica e orgânica, de modo que os fatores psicogênicos estão envolvidos em um número significativo de casos de disfunção erétil, seja sozinho ou em

combinação com causas orgânicas (SHAMLOUL; GHANEM, 2013). O Quadro 2 apresenta as principais causas orgânicas e psicogênicas da disfunção erétil.

Quadro 2. Principais causas orgânicas e fatores psicogênicos relacionados com a disfunção erétil (Adaptado de SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

Causas Orgânicas	Fatores Psicogênicos
<p>Neurogênicas Central (cerebral ou medula espinhal): esclerose múltipla, injúria da medula espinhal ou injúria cerebral Periférica: aferente (neuropatia sensorial, como diabetes mellitus e polineuropatia de diversas outras causas); eferente (neuropatia autonômica ou após cirurgia pélvica radical)</p>	<p>Fatores de Predisposição Experiências traumáticas anteriores Educação rígida Educação sexual inadequada Problemas de saúde físicos e mentais</p>
<p>Endocrinológicas Diabetes mellitus, hipogonadismo e hiperprolactinemia</p>	<p>Fatores Precipitantes Problemas de relacionamento Pressão familiar ou social Eventos como gravidez, nascimento, perda de emprego</p>
<p>Vasculogênicas Arterial: macro- ou microangiopatia (ex. aterosclerose e trauma) Venosa: falência do mecanismo veno-oclusivo corporal Sinusoidal: falência para relaxar (ex. fibrose)</p>	<p>Fatores de Manutenção Problemas de relacionamento Problemas de saúde físicos e mentais Desconhecimento das várias opções de tratamento</p>
<p>Depressão induzida por drogas Medicamentos: antihipertensivos, antidepressivos, antiandrógenos, tranquilizantes Fumo, alcoolismo, drogas recreativas (ex. maconha e heroína)</p>	
<p>Doenças sistêmicas e saúde geral comprometida Doença hepática, renal, respiratória e cardiovascular</p>	
<p>Fatores locais do pênis Fibrose cavernosa após priapismo ou devido a outras razões, doença de Peyronie e fratura peniana</p>	

Fisiologicamente, o processo de ereção envolve a contração e o relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos, de modo que a taxa de contração determina o estado funcional de flacidez, tumescência, ereção ou detumescência do pênis. Esse processo é controlado por mecanismos centrais, os quais são complexos e parcialmente elucidados, e periféricos, que envolvem fatores neuronais e locais com influência nos eventos vasculares no pênis (WILLIAMS; MELMAN, 2012).

O óxido nítrico é o principal mediador do relaxamento do músculo liso do pênis. Após estimulação sexual, a concentração de óxido nítrico é significativamente aumentada por conta da sua liberação das fibras colinérgicas e não-noradrenérgicas, não-colinérgicas e do endotélio. Pela via GTP/GMPc, há a diminuição do cálcio intracelular e conseqüente relaxamento do músculo liso trabecular; esse relaxamento dependente de óxido nítrico dos músculos lisos cavernosos leva à compressão das pequenas veias subtúnicas, ocluindo o retorno venoso local e resultando na ereção. A detumescência peniana, por sua vez, começa com a ativação dos receptores adrenérgicos nas artérias cavernosas e nos músculos liso trabecular, levando à redução do influxo arterial e um colapso dos espaços lacunares; a descompressão das vênulas de drenagem dos corpos cavernosos ocorre, permitindo a drenagem venosa dos espaços lacunares e alívio da ereção (SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

1.3.3 Tratamento

A disfunção erétil pode afetar negativamente a qualidade de vida do paciente e de seu parceiro sexual, de modo que o principal objetivo do tratamento é melhorar a função erétil para a satisfação do paciente e de seu parceiro (LEE, 2011). O diagnóstico da doença baseia-se na obtenção da história clínica, sexual e psicossocial do paciente, em exames físicos e laboratoriais, além de investigação com testes específicos para determinar, por exemplo, a presença e a severidade da doença, ou o tipo de disfunção erétil do paciente (orgânica ou psicogênica) (SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

A farmacoterapia é, atualmente, a principal abordagem de tratamento para a disfunção erétil e os inibidores de PDE5, a menos que contraindicados, são considerados o tratamento de primeira linha para a doença (EARDLEY, 2010; WILLIAMS; MELMAN, 2012; SHAMLOUL; GHANEM, 2013). Outras modalidades de tratamento incluem modificação dos hábitos de vida, terapias de injeção, terapia de testosterona,

dispositivos penianos e psicoterapia. A injeção intracavernosa e a terapia transuretral são abordagens para o tratamento de segunda linha da disfunção erétil e a sua principal vantagem é que a ereção atingida é previsível e ocorre rapidamente; geralmente, é indicada em pacientes que não responderam ao tratamento oral, e as drogas usualmente utilizadas são alprostadil, papaverina, fentolamina e polipeptídeo vasoativo intestinal. Os dispositivos constritivos a vácuo são reservados para pacientes em relacionamentos estáveis, que falharam com o tratamento oral de inibidores de fosfodiesterase e que recusaram outras opções mais invasivas. Nesse caso, a ereção não é natural e metade dos pacientes não estão satisfeitos com o método. Há ainda o tratamento de terceira linha, que envolve a implantação de prótese peniana, a qual é usualmente utilizada quando as outras modalidades de tratamento falharam ou não são preferidas pelos pacientes. A terapia psicosssexual, por sua vez, é indicada quando problemas psicológicos significativos são identificados e é utilizada principalmente em pacientes com disfunção erétil psicogênica (SHAMLOUL; GHANEM, 2013).

Após a introdução dos agentes ativos localmente, como papaverina, fentolamina e prostaglandina injetáveis nos anos 1980 e 1990, o primeiro agente oral eficaz, sildenafil, tornou-se disponível em 1998 e foi logo seguido por outros fármacos similares, como vardenafila e tadalafila. Os agentes orais possuem vantagens claras frente aos agentes aplicados localmente em termos de aceitabilidade e tolerabilidade e quase que imediatamente tornaram-se o tratamento de primeira linha para a maioria dos homens (EARDLEY, 2010). Esses três inibidores de PDE5 disponíveis em todo o mundo apresentam eficácia clínica conhecida no tratamento da disfunção erétil de diversas etiologias e severidades, além de um perfil de segurança favorável e boa tolerabilidade (WILLIAMS; MELMAN, 2012).

Esses fármacos facilitam a ereção pela inibição da enzima fosfodiesterase-5, que é especificamente responsável pela degradação do GMPc nos músculos lisos dos corpos cavernosos. Essa inibição resulta em atividade prolongada do GMPc, que reduz as concentrações de cálcio intracelular, mantendo o relaxamento do músculo liso e resultando na ereção rígida do pênis. A principal vantagem dos inibidores de PDE5 é a melhora da performance sexual e não da libido. Em homens jovens e potentes, os inibidores podem encurtar o período refratário e melhorar o controle da ejaculação (SHAMLOUL; GHANEM, 2013). Assim, os inibidores de PDE5 devem ser tomados em conjunto com a estimulação sexual, quando eles facilitarão o retorno da função erétil

normal. Nos pacientes que respondem ao tratamento, o homem atingirá uma ereção normal após a estimulação sexual, a qual persistirá até o orgasmo e ejaculação, seguida de detumescência. Atividade sexual repetida é possível enquanto o fármaco ainda estiver presente no organismo (EARDLEY, 2010).

No contexto da prática clínica atual, acredita-se que sejam necessários mais esforços para se alcançar um balanço ideal entre a taxa de eficácia e segurança do uso de sildenafil em homens com disfunção erétil, por exemplo considerando-se regimes de doses flexíveis para minimizar a incidência dos principais efeitos adversos, como dor de cabeça, rubor facial e rinite, e/ou a exploração e comparação de diferentes modos de otimização de dose de sildenafil (TSERTSVADZE *et al.*, 2009). Sendo assim, o desenvolvimento de novas formulações orais, líquidas, que permitam o ajuste posológico e alterem o perfil farmacocinético de modo a facilitarem a administração do medicamento imediatamente antes da relação sexual, poderia contribuir para a melhora da qualidade de vida de muitos pacientes com disfunção erétil.

1.4 SISTEMAS LÍQUIDOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A via oral é considerada a via para administração de fármacos mais benéfica do ponto de vista fisiológico, além de ser facilmente aceita pelos pacientes e ser comumente empregada para a liberação de fármacos no tratamento crônico de diversas doenças (GURSOY; BENITA, 2004; ZHANG, 2008). Entre as formas farmacêuticas utilizadas por via oral, as formulações líquidas apresentam vantagens como a possibilidade de ajuste posológico e a facilidade de administração. As soluções são a forma farmacêutica líquida mais comum e podem ser definidas como preparações líquidas que contêm uma ou mais substâncias dissolvidas em um solvente adequado ou em uma mistura de solventes mutuamente miscíveis. Do ponto de vista farmacocinético, as soluções são preferíveis por apresentarem o fármaco solúvel no veículo utilizado, podendo sua absorção ocorrer mais rapidamente do que uma suspensão ou uma forma sólida oral deste mesmo fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

No entanto, a liberação de aproximadamente metade dos fármacos administrados por via oral é comprometida por causa de sua alta lipofilicidade (GURSOY; BENITA, 2004; ZHANG, 2008). Nos últimos anos, verificou-se que a maioria das novas moléculas candidatas a fármacos exibe baixa solubilidade em água, levando à

baixa biodisponibilidade oral, alta variabilidade intra- e inter-indivíduos e baixa proporcionalidade de dose (GURSOY; BENITA, 2004; KAWABATA, 2011). Esse fato tem representado um grande desafio para o sucesso da formulação e do marketing de novos fármacos na indústria farmacêutica (LIPINSKI *et al.*, 2001). Da mesma forma, tem se tornado relevante a busca por novas formas de administração oral que melhorem a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água para se obter efeitos terapêuticos mais eficazes (ZHANG, 2008; WOO *et al.*, 2008).

Nesse contexto, diversas estratégias têm sido utilizadas para melhorar a baixa solubilidade de fármacos lipofílicos, como o uso de ciclodextrinas, surfactantes, nanopartículas, dispersões sólidas e micronização. Uma das estratégias mais populares para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos lipofílicos, no entanto, tem sido a utilização de promotores de permeação e a incorporação desses ativos em veículos lipídicos inertes, como óleos, dispersões de surfactantes, emulsões, lipossomas e formulações autoemulsionantes, como os sistemas de liberação de fármacos autoemulsionantes (CONSTANTINIDES, 1995; POUTON, 1997; GURSOY; BENITA, 2004; KANG *et al.*, 2004; KOHLI *et al.*, 2010).

Sistemas autoemulsionantes de liberação de fármacos, conhecidos pela sigla SEDDS (*self-emulsifying drug delivery systems*), são misturas de óleos e surfactantes, podendo incluir cossolventes, que formam soluções isotrópicas, límpidas e transparentes, que possuem a habilidade de emulsificar, formando finas emulsões óleo em água, quando expostas ao meio aquoso sob agitação moderada (CONSTANTINIDES, 1995; POUTON, 1997). O termo SEDDS é abrangente, tipicamente utilizado para as formulações que produzem emulsões com gotículas de tamanhos que variam de poucos nanômetros a alguns micrometros. Muitos autores têm utilizado também os termos SMEDDS (*self-microemulsifying drug delivery systems*), para as formulações que formam microemulsões transparentes com tamanho de gotículas entre 100 e 250 nm, e SNEDDS (*self-nano-emulsifying drug delivery systems*), para aquelas que formam gotículas de tamanhos inferiores a 100 nm (KOHLI *et al.*, 2010).

Após a administração de uma formulação do tipo SEDDS, a motilidade digestiva do estômago e do intestino fornece a agitação necessária para que a autoemulsificação ocorra *in vivo* (CONSTANTINIDES, 1995; POUTON, 1997) e espera-se que essa emulsificação ocorra rapidamente no conteúdo aquoso do estômago, permitindo a apresentação do fármaco em solução nas pequenas gotículas de óleo (inferiores a 5 µm),

que formam a fase interna da emulsão. As finas gotículas de óleo são rapidamente esvaziadas do estômago e promovem uma ampla distribuição do fármaco pelo trato gastrointestinal, minimizando a irritação que ocorre frequentemente com o contato extensivo entre o fármaco e a parede intestinal. Outra vantagem dos SEDDS sobre as soluções oleosas simples é que eles fornecem uma grande área de superfície interfacial para a absorção do fármaco; para fármacos com absorção limitada pela taxa de dissolução, SEDDS podem oferecer uma melhora tanto na taxa quanto na extensão da absorção e na reprodutibilidade nos perfis de concentração plasmática (CHARMAN *et al.*, 1992).

Em seu trabalho, Pouton (2000) afirmou que o mecanismo de ação primário que leva à melhora da biodisponibilidade é normalmente o impedimento total ou parcial do processo lento de dissolução que limita a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos de formas farmacêuticas sólidas convencionais; idealmente, essas novas formulações permitem que o fármaco permaneça no seu estado dissolvido durante o trânsito pelo trato gastrointestinal (POUTON, 2000). A vantagem da aplicação dos SEDDS está exatamente relacionada com a apresentação do fármaco em gotículas pequenas e proporcionalmente distribuído, aumentando a sua dissolução e permeabilidade. Além disso, SEDDS podem manter o fármaco na sua fase interna e proteger o mesmo de sofrer hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, reduzindo o *clearance* pré-sistêmico e o efeito de primeira passagem (KOHLI *et al.*, 2010).

A eficiência da absorção oral de fármacos a partir de formulações autoemulsionantes depende de diversos parâmetros relacionados à formulação, entre eles: a concentração do surfactante, a razão de óleo/surfactante e o tamanho da gotícula, de forma que apenas combinações específicas de excipientes farmacêuticos levarão a sistemas autoemulsionantes eficientes (ELNAGGAR; EL-MASSIK; ABDALLAH, 2009). Diversos tipos de formulações lipídicas têm sido desenvolvidos e, com o objetivo de acelerar a interpretação de resultados de estudos *in vivo* com essas formulações e facilitar a escolha da formulação mais apropriada para cada tipo de fármaco, Pouton e seu grupo de pesquisa estabeleceram um método de classificação para os diferentes tipos de formulações lipídicas (POUTON, 2000; POUTON; PORTER, 2008), conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3. Classificação dos sistemas lipídicos (Adaptado de POUTON; PORTER, 2008).

Formulação	Excipientes	Propriedades
Tipo I	Óleos sem surfactantes (ex. tri-, di- e monoglicéridos)	Não-dispersante; requer digestão
Tipo II	Óleos e surfactantes insolúveis em água	SEDDS formados sem componentes solúveis em água
Tipo III	Óleos, surfactantes e cossolventes (excipientes solúveis e insolúveis em água)	SEDDS/SMEDDS formados com componentes solúveis em água
Tipo IV	Surfactantes solúveis em água e cossolventes (sem óleos)	Formulações dispersam tipicamente para formar uma solução micelar

Diversos fármacos tiveram sua biodisponibilidade melhorada após a utilização de SEDDS, como por exemplo: sinvastatina (KANG *et al.*, 2004), coenzima Q10 (KOMMURU *et al.*, 2001), celecoxib (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004), silimarina (WEI *et al.*, 2006), itraconazol (WOO *et al.*, 2008) e pranlukast (BAEK *et al.*, 2013). Além disso, algumas formulações do tipo SEDDS estão disponíveis no mercado, como Agenerase® (amprenavir, GlaxoSmithKline), Aptivus® (tipranavir, Boehringer Ingelheim), Accutane® (isotretinoína, Roche) e Gengraf® (ciclosporina A, Abbott), entre outros (KOHLI *et al.*, 2010), todas disponíveis em cápsulas gelatinosas moles.

1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando os impactos sócio-econômicos da HAP e da DE, a proposta do presente trabalho é o desenvolvimento de um SEDDS para melhorar a biodisponibilidade do citrato de sildenafil. Tanto no tratamento da HAP quanto no tratamento da disfunção erétil, uma nova forma farmacêutica líquida oral com melhor biodisponibilidade, que permita o ajuste posológico para individualização do tratamento e que facilite a administração visando a melhora da qualidade de vida do paciente, é de grande relevância para os pacientes com HAP e com disfunção erétil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de soluções orais e sistemas de liberação autoemulsionantes de citrato de sildenafil capazes de modular a absorção e a estabilidade do fármaco e permitir ajuste posológico para uso no tratamento da hipertensão arterial pulmonar e/ou da disfunção erétil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar e caracterizar as soluções orais de citrato de sildenafil.
2. Preparar e caracterizar os sistemas autoemulsionantes de liberação de citrato de sildenafil.
3. Estudar a estabilidade das formulações.
4. Avaliar o comportamento dos sistemas autoemulsionantes nos meios de liberação.
5. Avaliar a permeação intestinal das formulações comparando o sistema autoemulsionante com a solução.
6. Avaliar a toxicidade das formulações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, Reagentes, Matérias-Primas

Acetato de amônio grau CLAE – Tedia

Acetonitrila grau CLAE – Tedia

Ácido clorídrico – Spectrum

Água Purificada (MilliQ) – Millipore

Azul de metileno – Sigma Aldrich

Brometo de potássio – Shimadzu

Citrato de Sildenafil – Rakshit – Índia

Citrato de Sildenafil (padrão de trabalho) – PGS – EUA

Cloreto de sódio P.A. – Reagen

Éter etílico P.A. – Vetec

Fosfato de potássio monobásico P.A. – Reagen

Hidróxido de Sódio P.A. – Vetec

Isobutanol – Tedia

Metabissulfito de sódio – Henrifarma

2-pirrolidona – Soluphor®P – Basf

Sacarina sódica – Vetec

Tubo de celulose para diálise 33 mm (1,3 in) – Sigma Aldrich

Span®20 – Sigma Aldrich

Span®80 – Sigma Aldrich

Tween®80 – Vetec

3.1.2 Equipamentos

Analizador de Tamanho de Gotícula – Malvern Zetasizer Nano Series

Analizador Termogravimétrico – Shimadzu TGA-50

Balança Analítica – Mettler Toledo AG 204

Banho Ultratermostático – Cientec CT281-9

Bomba Dosadora Peristáltica – Milan BP-600

Calorímetro Diferencial de Varredura – Shimadzu DSC-60

Câmara Climática – Nova Ética 420/LCD 150

Coluna cromatográfica C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) – Kromasil

Condutivímetro – Quimis

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Perkin Elmer Flexar Isocratic LC250

Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier – Shimadzu FT-IR
Prestige 21

Pipeta automática – HTL LABMATE Soft

Placa aquecedora com agitação magnética – Corning PC230

Potenciômetro – Quimis

Refratômetro de Abbe – Analikjena

Software Chemix®

Vidraria – Pyrex

Viscosímetro de Brookfield – Synchro-Lectric Modelo LVT

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise de Identificação do Citrato de Sildenafil

3.2.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF)

As análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro, Shimadzu FT-IR Prestige 21. As amostras analisadas foram obtidas a partir do preparo de uma pastilha proveniente da mistura de citrato de sildenafil (aproximadamente 3 mg) com brometo de potássio (KBr), compactada em prensa hidráulica, sob 15 bar de pressão, por 2 minutos. Foram analisadas amostras de citrato de sildenafil padrão de referência (PGS - EUA) e de citrato de sildenafil insumo farmacêutico (Rakshit - Índia) utilizado no preparo das formulações desse trabalho e denominado citrato de sildenafil amostra.

A varredura de cada espectro foi feita entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . As posições das bandas nos espectros foram apresentadas em número de ondas (ν) cuja unidade é o centímetro inverso (cm^{-1}) e as intensidades das bandas estão expressas como transmitância (T). As bandas observadas no espectro serão caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que as representam.

3.2.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)

As análises de DSC foram realizadas utilizando-se o equipamento Shimadzu DSC-60. Amostras de cerca de 1,5 – 2 mg de citrato de sildenafil amostra e padrão de referência foram pesadas em recipiente de alumínio e analisadas sob atmosfera de nitrogênio na faixa de temperatura de 10 a 350°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min.

As análises de TGA foram realizadas utilizando-se equipamento Shimadzu TGA-50. Amostras de cerca de 4 – 5 mg de citrato de sildenafil amostra e padrão de referência foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio na faixa de temperatura de 10 a 700°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min.

3.2.2 Validação de Metodologia Analítica para Quantificação de Citrato de Sildenafil por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A metodologia analítica para quantificação de citrato de sildenafil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para a determinação do teor das formulações durante as etapas de desenvolvimento e caracterização das mesmas e, posteriormente, durante o estudo de estabilidade acelerada e o ensaio de permeação intestinal.

O método empregado foi baseado naquele proposto por Daraghme e colaboradores (2001), o qual mostrou-se ser simples, específico, preciso, robusto e reproduzível. As condições cromatográficas do método envolvem a utilização de coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel composta de tampão de acetato de amônio 0,2 M, pH 7,0 e acetonitrila (50:50), fluxo de 1,0 ml/min, detector ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 240 nm, volume de injeção de 20 µl e temperatura de 35°C.

A validação da metodologia foi realizada para garantir que o método escolhido atendesse às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados do estudo realizado, conforme preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

A validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, anexo da RE N° 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA (ANVISA, 2003) e, para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

3.2.2.1 Condições Cromatográficas e Preparo de Soluções

As análises foram realizadas em cromatógrafo Flexar, Perkin Elmer, gentilmente cedido pelo Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (LabCQ), empregando-se coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Kromasil, mantida em temperatura de 35°C durante as análises. O volume de injeção utilizado foi de 20 µl e o fluxo de fase móvel foi estabelecido em 1,0 ml/min. A detecção realizada por ultravioleta foi realizada em comprimento de onda de 240 nm.

A fase móvel foi constituída de tampão acetato de amônio e acetonitrila na proporção de 50:50. O tampão de acetato de amônio foi preparado a 0,2 M, pH 7,0, em balão volumétrico, utilizando água MilliQ como veículo.

Para o preparo da solução estoque padrão de sildenafil, foram pesados, com precisão analítica, 17,5 mg de citrato de sildenafil padrão de referência, que foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml, cujo volume foi completado com a fase móvel descrita acima, resultando em uma solução a 500 µg/ml. O cálculo da pesada de citrato de sildenafil considerou o fator de correção (Fc) de 1,4, dado pela Equação 1:

$$Fc = \frac{\text{Peso Molecular do citrato de sildenafil}}{\text{Peso Molecular de sildenafil base}} = \frac{666,7}{474,6} = 1,4. \quad (\text{Equação 1})$$

As soluções de citrato de sildenafil padrão de referência eram diluições da solução estoque e foram preparadas nas concentrações de 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml e 250 µg/ml a fim de se obter a curva padrão. Tais soluções eram preparadas em todos os dias de análise.

3.2.2.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes; em análises quantitativas, para determinação de teor, a especificidade pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos de amostras do fármaco contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (ANVISA, 2003).

A especificidade foi avaliada pela comparação dos picos obtidos nas análises da solução de citrato de sildenafil padrão de trabalho 100 µg/ml em fase móvel e das amostras das formulações em concentração próxima a 100 µg/ml.

3.2.2.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Para a avaliação da linearidade, foram preparadas três curvas padrão de citrato de sildenafil padrão de trabalho com faixa de concentração de 10 a 250 µg/ml. Em dias

diferentes, para cada curva padrão, foram preparadas 5 soluções de trabalho nas concentrações de 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml e 250 µg/ml, correspondentes aos pontos da curva de calibração. As injeções de cada uma das soluções foram feitas em triplicata.

A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear. O critério de linearidade foi a obtenção do coeficiente de correlação (r) com valor mínimo de 0,99, conforme determinado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

3.2.2.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). Foram avaliadas a precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária).

Foram preparadas seis soluções a 100% da concentração do teste, ou seja, a 100 µg/ml, e a análise de precisão foi realizada pela determinação do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), que deve ser menor do que 5% (ANVISA, 2003).

3.2.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados com base na equação da reta, aplicando-se as Equações 2 e 3 apresentados abaixo:

$$LD = (DP \times 3) / IC \quad \text{(Equação 2)}$$

$$LQ = (DP \times 10) / IC \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas de, no mínimo, 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

3.2.2.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

Inicialmente, foram preparadas três soluções de citrato de sildenafil padrão de referência em triplicata com níveis de concentração diferentes: baixo (80 µg/ml), médio (100 µg/ml) e alto (120 µg/ml). Em seguida, foram preparadas soluções em fase móvel de placebo contaminado com o fármaco nos mesmos níveis de concentração acima citados. Foram realizadas três injeções de cada amostra.

Para o cálculo da exatidão do método, foi considerada a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra (ANVISA, 2003), com limite considerado aceitável entre 98% e 102% de recuperação.

3.2.2.7 Robustez

A robustez é a medida da capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos; indica a sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003).

Para a determinação da robustez, foram preparadas soluções de 100 µg/ml de citrato de sildenafil padrão de trabalho. Foram testadas as seguintes variações das condições cromatográficas:

- variação do fluxo da fase móvel de 1,0 ml/min para 1,1 ml/min e para 0,9 ml/min;
- variação da temperatura de 35°C para 40°C;
- variação da proporção de tampão de acetato de amônio 0,2 M, pH 7,0 e acetonitrila na fase móvel de 50:50 para 45:55.

3.2.2.8 Preparo das Amostras

As amostras das formulações quantificadas pela metodologia descrita acima foram preparadas de modo a se obter amostras com concentrações teóricas próximas a 100 µg/ml.

Para o preparo das amostras da solução de sildenafil 3,3%, 1 ml dessa solução foi transferido com pipeta volumétrica para balão volumétrico de 100 ml, cujo volume

final foi completado com acetonitrila. O balão volumétrico foi levado ao banho de ultrassom por 20 minutos. Dessa solução, foram retirados 3 ml com pipeta volumétrica, os quais foram transferidos para um balão volumétrico de 10 ml, cujo volume foi completado com fase móvel, obtendo-se a amostra a ser analisada no cromatógrafo.

Para o preparo das amostras dos sistemas autoemulsionantes de liberação de fármacos, identificados nesse trabalho pela sigla SEDDS, foram realizados os seguintes procedimentos: para o preparo das amostras de SEDDS 3,3%, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima para a solução 3,3%, considerando 1 g do SEDDS para a primeira diluição; para o preparo das amostras de SEDDS 1,3%, 1 g do SEDDS foi transferido para balão volumétrico de 25 ml, cujo volume final foi completado com acetonitrila. Dessa solução, foram retirados 5 ml com pipeta volumétrica, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml contendo fase móvel, obtendo-se dessa forma a amostra a ser analisada.

3.2.3 Preparo e Caracterização das Formulações

3.2.3.1 Preparo das Soluções

As soluções escolhidas para serem utilizadas como objeto de estudo foram preparadas de acordo com o trabalho desenvolvido por De Paula (2010), no nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (LabTIF-UFRJ).

As formulações foram preparadas utilizando-se a 2-pirrolidona como solvente e água como veículo em quantidade suficiente para se obter o volume final da formulação. Os excipientes adicionados foram a sacarina como edulcorante e o metabissulfito de sódio como antioxidante da formulação (DE PAULA, 2010).

Foram estudadas diferentes concentrações de sildenafil (3,3%, 5,0% e 7,5%) para o preparo das soluções, considerando a solubilidade do fármaco no solvente escolhido e a necessidade da racionalização da quantidade de gotas a serem administradas para se atingir as doses usualmente empregadas (DE PAULA, 2010).

O preparo das soluções foi realizado pela incorporação do citrato de sildenafil em 2-pirrolidona previamente aquecida a 30°C, com agitação magnética por 15 minutos

e posterior adição da sacarina e do metabissulfito de sódio previamente dissolvidos em água.

Além das variações das concentrações do fármaco (3,3%, 5,0% e 7,5%), também foram consideradas variações na quantidade de 2-pirrolidona utilizada (10 ml, 20 ml e 30 ml), uma vez que a quantidade do solvente é um dos fatores que pode influenciar na solubilidade do fármaco.

Para o cálculo da quantidade de citrato de sildenafil utilizado em cada concentração, considerou-se o fator de correção de 1,4, determinado pela Equação 1.

3.2.3.2 Caracterização das Soluções

3.2.3.2.1 Determinação do Teor

A determinação do teor de sildenafil das soluções foi realizada empregando-se a metodologia de quantificação por CLAE descrita no item 3.2.2.1, com preparo das amostras seguindo o procedimento descrito no item 3.2.2.8.

3.2.3.2.2 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro Quimis previamente calibrado, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.2.3 Avaliação do Aspecto Visual

Uma pequena amostra da solução foi transferida para um bécher de 10 ml e era observada contra a luz e em fundo branco, com o objetivo de verificar o possível aparecimento de sedimento ou alteração de cor da formulação.

3.2.3.3 Preparo dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)

Os SEDDS contendo citrato de sildenafil desenvolvidos nesse estudo foram elaborados com base nas metodologias empregadas por Nandi, Bari & Joshi (2003) e Constantinides (1995), que vêm sendo amplamente pesquisadas pelo nosso grupo de

trabalho no LabTIF-UFRJ (MONTEIRO, 2011; CARMO, 2011). No entanto, foram consideradas modificações nos componentes utilizados a fim de se estudar novas propostas de sistemas de liberação e de ajustá-las para o fármaco em questão.

Dessa forma, para a obtenção de tais formulações, foram preparadas uma fase orgânica composta do solvente 2-pirrolidona e do cossolvente isobutanol e uma mistura de tensoativos não-iônicos contendo Tween®80:Span®20 (SEDDS 1) ou Tween®80:Span®80 (SEDDS 2) para a estabilização das formulações. As proporções utilizadas foram de 1:1 na mistura de tensoativos e de 8:1 na relação entre a 2-pirrolidona e o isobutanol, compondo a fase orgânica da formulação (NANDI; BARI; JOSHI, 2003).

O procedimento para o preparo das formulações foi realizado nas seguintes etapas: mistura dos tensoativos; adição do isobutanol e da 2-pirrolidona, sob agitação magnética; adição da água e incorporação do fármaco, também sob agitação magnética, à temperatura ambiente, até completa solubilização do mesmo (NANDI; BARI; JOSHI, 2003; MONTEIRO, 2011; CARMO, 2011).

Com o objetivo de se obter o limite de incorporação do fármaco nas formulações, foram feitas adições subseqüentes do fármaco no sistema de liberação, mantido em temperatura ambiente, sob agitação magnética, por 24 horas, até se obter a saturação, quando eram observados precipitados do fármaco.

3.2.3.3.1 Construção do Diagrama Pseudoternário de Fases

Os diagramas pseudoternários de fases foram construídos para se avaliar a formação dos sistemas microemulsionados utilizando-se os componentes escolhidos para a fase orgânica e para a mistura de tensoativos e, posteriormente, se estabelecer as proporções dos mesmos nas formulações.

A construção dos diagramas foi realizada utilizando-se o método de titulação com água, em que misturas da fase orgânica/cossolvente (2-pirrolidona e isobutanol – 8:1) e de surfactantes (Tween®80:Span®20 ou Tween®80:Span®80 – 1:1) em proporções iguais a 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 e 10:90 são diluídas pela adição seqüencial de 10 µl de água utilizando-se pipeta automática até a quantidade máxima de água adicionada que ainda mantenha o sistema límpido e pouco viscoso

(NANDI, BARI & JOSHI, 2003). Por fim, as proporções de cada componente da formulação foram recalculadas.

Cada análise foi realizada em triplicata e para a construção dos diagramas foi considerada a média dos resultados obtidos. Os diagramas foram construídos com o auxílio do software Chemix®.

3.2.3.4 Caracterização dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)

3.2.3.4.1 Determinação do Teor

A determinação do teor de sildenafil dos SEDDS foi realizada empregando-se a metodologia de quantificação por CLAE descrita no item 3.2.2.1, com preparo das amostras seguindo o procedimento descrito no item 3.2.2.8.

3.2.3.4.2 Determinação da Viscosidade

A determinação da viscosidade dos SEDDS foi realizada em viscosímetro de Brookfield Synchro-Lectric Modelo LVT do LabCQ/UFRJ, acoplado ao Spindle 2 LV. As leituras foram realizadas nas velocidades angulares de 0,3 rpm, 0,6 rpm e 1,5 rpm, à temperatura de 25°C.

3.2.3.4.3 Determinação da Condutividade

A condutividade dos SEDDS foi medida em condutivímetro Quimis previamente calibrado a uma condutividade de 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ com solução de cloreto de sódio (NaCl) de concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

As análises foram realizadas em triplicata e tiveram o objetivo de determinar a característica das formulações como sistemas microemulsionados do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) e de avaliar a estabilidade das preparações.

3.2.3.4.4 Determinação do Índice de Refração

A determinação do índice de refração das formulações de SEDDS foi feita pela análise no refratômetro de Abbe Analikjena do LabCQ/UFRJ, previamente calibrado.

O índice de refração é um parâmetro importante para a avaliação da estabilidade dos sistemas de liberação, além de contribuir para a determinação do tipo de sistema que está sendo desenvolvido: O/A ou A/O.

3.2.3.4.5 Avaliação do Aspecto Visual

Uma pequena amostra de cada um dos SEDDS foi transferida para um bécher de 10 ml e era observada contra a luz e em fundo branco, com o objetivo de verificar o possível aparecimento de sedimento, alteração de cor ou a ocorrência de separação de fases da formulação.

3.2.4 Estudo de Estabilidade

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de diversos fatores, sejam eles fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, ou fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas dos princípios ativos e excipientes farmacêuticos, da forma farmacêutica e de sua composição; o processo de fabricação e o tipo de material utilizado na embalagem também podem influenciar na estabilidade (ANVISA, 2012).

A avaliação da estabilidade de um produto farmacêutico pode ser feita pelo estudo de estabilidade acelerado, que é um estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento (ANVISA, 2012).

O estudo de estabilidade acelerado das formulações preparadas foi realizado com base na RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012 (ANVISA, 2012). Para a realização desse estudo, foram preparadas amostras das formulações de solução de 3,3% de sildenafil em 2-pirrolidona (SSP 3,3%), SEDDS 1A (1,3% de sildenafil), SEDDS 1B (3,3% de sildenafil), SEDDS 2A (1,3% de sildenafil) e SEDDS 2B (3,3% de sildenafil), conforme descrito nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.3. Para cada tipo de formulação preparada, foram

separadas seis alíquotas de 20 ml, as quais foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar com tampa de polietileno de alta densidade com lacre, devidamente identificadas.

Após o preparo, as amostras foram submetidas a condições forçadas de temperatura e umidade ao serem armazenadas em câmara climática com temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $75\% \pm 5\%$, conforme determinado pela legislação acima citada.

O estudo de estabilidade acelerado foi realizado por três meses e as amostras foram recolhidas nos tempos de 15, 30, 60, 90 dias. As análises de caracterização das formulações eram realizadas no dia da retirada da amostra e os resultados eram comparados àqueles obtidos no momento zero.

3.2.4.1 Estudo de Estabilidade da Solução

As amostras da solução 3,3% foram avaliadas em cada intervalo do estudo de estabilidade pela determinação do teor, determinação de pH e avaliação do aspecto visual, de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.3.2.

3.2.4.2 Estudo de Estabilidade dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos (SEDDS)

As amostras de cada um dos SEDDS foram avaliadas em cada intervalo do estudo de estabilidade pela determinação do teor, da condutividade e do índice de refração, conforme os procedimentos descritos no item 3.2.3.4.

3.2.5 Avaliação do Comportamento dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármacos nos Meios de Liberação

O estudo de avaliação do comportamento dos sistemas nos meios de liberação de suco gástrico e suco entérico simulados foram realizados para o SEDDS 1 e SEDDS 2 com o objetivo de se observar o comportamento desses sistemas na mimetização da sua passagem pelo trato gastrointestinal humano.

Para o preparo do meio de suco gástrico simulado, 1 g de cloreto de sódio foi dissolvido em água purificada, 5 ml de ácido clorídrico 0,2 N foram adicionados e o

volume final de 1000 ml foi completado com água destilada. O pH final da solução foi ajustado para $1,2 \pm 0,1$. Para o preparo do meio de suco entérico simulado, por sua vez, 6,8 g de fosfato de potássio monobásico foram dissolvidos em aproximadamente 200 ml de água, 77 ml de hidróxido de sódio 0,2 N foram adicionados e o volume final de 1000 ml foi completado com água destilada. O pH final da solução foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$.

Após o preparo dos meios, 10 g de cada sistema foram colocados em sacos de diálise de celulose, previamente fervidos, com o objetivo de remover resíduo de gordura e hidratá-los. Os sistemas foram colocados em um bécher contendo 100 ml do meio de suco gástrico simulado e em outro bécher contendo 100 ml do meio de suco entérico simulado. Os bécheres foram mantidos sob agitação magnética por 24 horas e, posteriormente, uma alíquota de cada um dos quatro bécheres foi retirada para análise do tamanho de gotícula.

A análise da distribuição do tamanho de gotículas dos SEDDS foi realizada por equipamento de espalhamento de luz a laser Malvern Zetasizer Nano Series. Empregou-se célula de quartzo de 1 cm de caminho ótico, à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em triplicata, de modo que cada análise corresponde à média de dez determinações.

3.2.6 Ensaio de Permeação em Intestino Isolado de Rato

O ensaio de permeação em intestino isolado de rato foi realizado com o objetivo de se avaliar a absorção intestinal de citrato de sildenafila presente nas formulações desenvolvidas.

Para a realização do ensaio, ratos Wistar, pesando de 250 a 300 g, foram previamente eutanasiados com éter. Em seguida, foi realizada uma incisão abdominal para a retirada do jejuno, que foi dividido em três segmentos de oito centímetros cada, conforme Figura 4.



Figura 4. Segmentos do jejuno canulados em suas extremidades para a realização do ensaio de permeação.

Nas duas extremidades de cada segmento do jejuno, foram introduzidas cânulas, de modo que uma extremidade estava ligada a uma bomba peristáltica, que bombeava a formulação em um fluxo de 1,2 ml/min e a outra extremidade permanecia livre para recolhimento do material que havia passado pelo intestino. Cada porção intestinal foi acondicionada em câmaras de perfusão mantidas com circulação de água a 37°C, contendo 10 ml de tampão fosfato pH 7,4 (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Solution*), aerado por carbogênio, como meio receptor. As Figuras 5 e 6 mostram o aparato utilizado e o detalhe de uma câmara contendo o segmento intestinal, respectivamente.

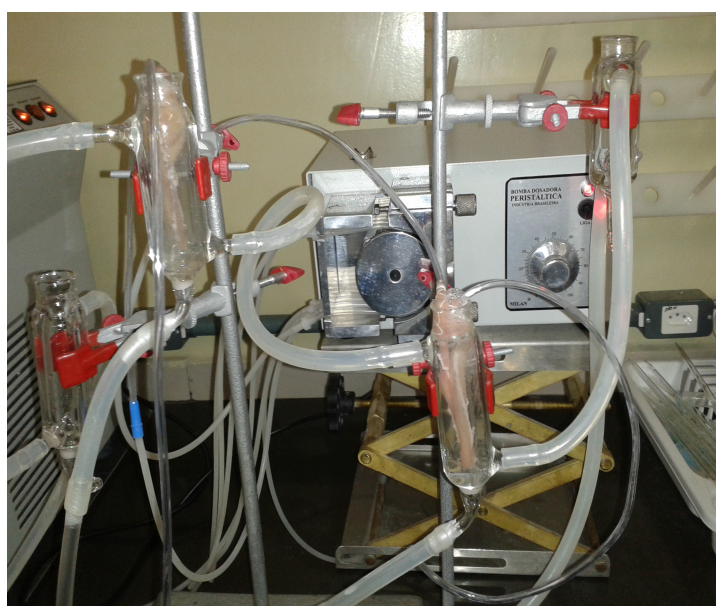


Figura 5. Aparato do ensaio de permeação intestinal.

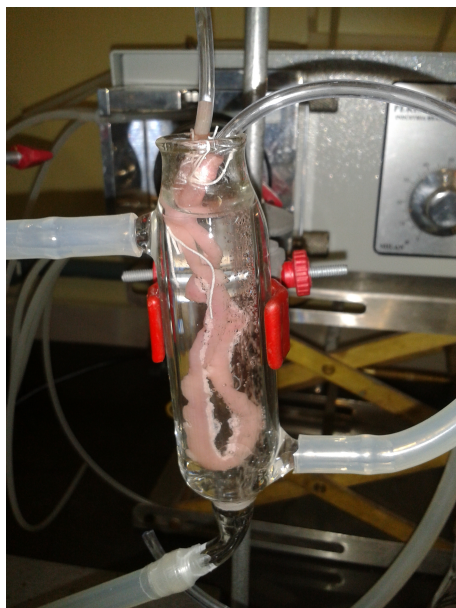


Figura 6. Câmara de perfusão contendo um segmento intestinal.

As formulações selecionadas para o ensaio de permeação foram: solução de sildenafil 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%), SEDDS 2B (3,3% de sildenafil) e citrato de sildenafil disperso em PBS pH 6,8. Cada formulação analisada foi dispersa em PBS pH 6,8 (meio doador), obtendo-se uma concentração final de 1,5 mg de sildenafil base por mililitro. Alíquotas de 1 ml do meio receptor foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos com reposição do meio e analisadas por CLAE, conforme metodologia descrita anteriormente no item 3.2.2.1.

Ao final do ensaio, uma solução de azul de metileno foi utilizada para verificar a integridade da mucosa intestinal, conforme apresentado na Figura 7.



Figura 7. Porção intestinal contendo solução de azul de metileno.

O ensaio de permeação em intestino isolado de rato, acima descrito, teve sua aprovação concedida pelo Comitê de Ética do Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFRJ sob o número FARMÁCIA 06 – 11/15.

Os resultados de permeação foram plotados com valores médios \pm desvio padrão (DP), tomando-se como referência $n = 3$. Os valores de área sob a curva (AUC) foram calculados pelo método trapezoidal (TAKIZAWA *et al.*, 2013). Para a análise estatística, foi empregado o teste T, utilizando o software SigmaPlot 11.0.

3.2.7 Avaliação da Toxicidade das Formulações

O estudo da toxicidade das formulações placebo foi realizado com base na dose letal média oral (DL50) do fármaco e teve como objetivo verificar a toxicidade dos veículos utilizados nas formas farmacêuticas desenvolvidas neste trabalho.

Para a execução do ensaio, foi selecionado o volume de 300 μ l do placebo da solução SSP e do placebo do SEDDS 2, por se tratar de um volume facilmente administrável aos animais e que corresponderia ao volume necessário para administrar 495 mg de sildenafil por quilograma de peso do animal. Essa quantidade de fármaco é comparável à DL50 de 500 a 1000 mg de sildenafil por quilograma de peso, já determinada experimentalmente para o fármaco em estudo (PFIZER, 2008).

O ensaio foi realizado com camundongos albinos *Swiss*, pesando 20 g \pm 2 g, os quais foram divididos em 2 grupos de cinco animais. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado com ciclo de claro-escuro e observados durante 7 dias, constatando-se a sobrevivência dos mesmos após a administração das formulações. Foram administrados, por gavagem, 300 μ l das formulações apresentadas na tabela abaixo.

Tabela 1. Formulações utilizadas na avaliação da toxicidade.

GRUPO	AMOSTRA
1	Placebo da Solução SSP
2	Placebo do SEDDS 2

Este ensaio teve sua aprovação concedida pelo Comitê de Ética do Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFRJ sob o número FARMÁCIA 015 – 08/16.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE IDENTIFICAÇÃO DO CITRATO DE SILDENAFILA

4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF)

Foram analisados o citrato de sildenafil padrão de referência e o citrato de sildenafil amostra, utilizado para o preparo das formulações desse trabalho. As análises resultaram nos espectros apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Ambos os espectros apresentam perfis semelhantes e as principais bandas observadas estão de acordo com dados de análises de espectroscopia por infravermelho feitas por outros pesquisadores, o que permitiu a identificação do citrato de sildenafil e a confirmação da identidade da amostra a ser utilizada neste trabalho.

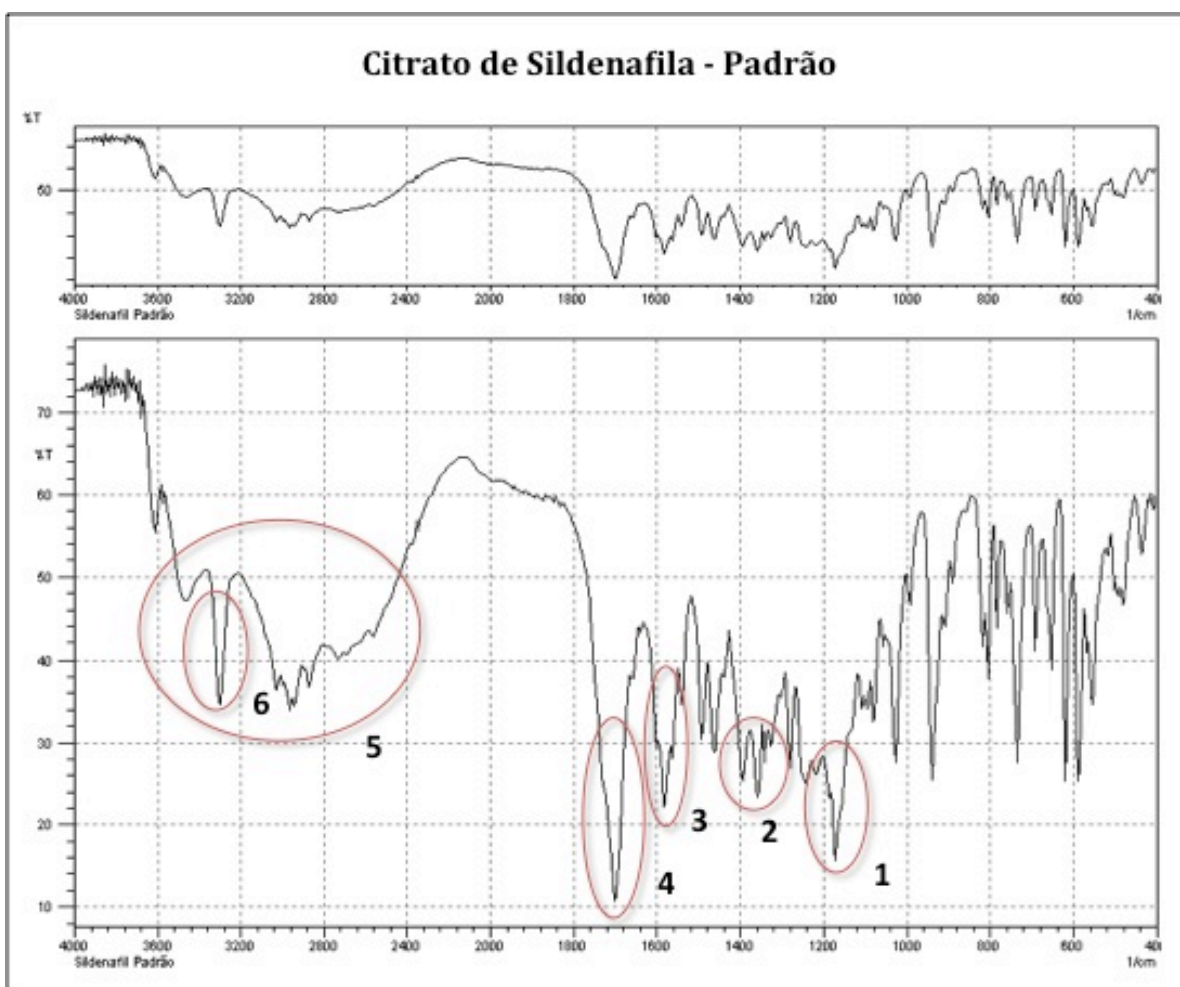


Figura 8. Espectro de IV-TF do citrato de sildenafil padrão.

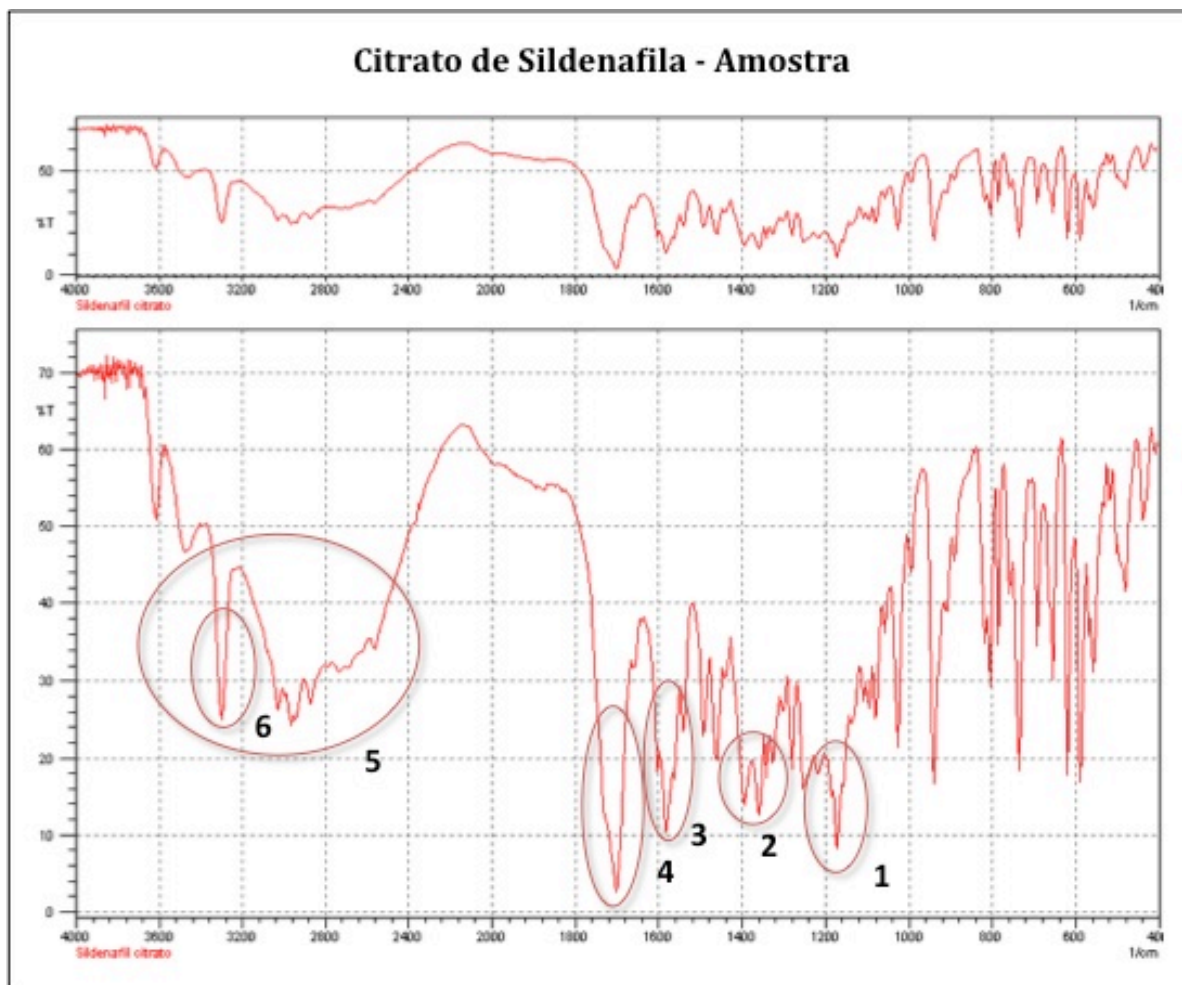


Figura 9. Espectro de IV-TF do citrato de sildenafil amostra.

As bandas características da molécula do citrato de sildenafil observadas em ambos os espectros estão assinaladas nas figuras e descritas detalhadamente a seguir: as vibrações de estiramento simétrico próximo a 1170 cm^{-1} (1) e assimétrico próximo a 1360 cm^{-1} (2) indicam a presença do grupamento $-\text{SO}_2$ na molécula; a banda forte presente no comprimento de onda próximo a 1580 cm^{-1} (3) refere-se à vibração de estiramento simétrico dos grupos carboxila ($-\text{COOH}$) que são pertencentes ao íon citrato; a vibração de estiramento em 1700 cm^{-1} refere-se ao grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$)(4); o alargamento das bandas de vibração de estiramento na região de 2700 a 3600 cm^{-1} (5) é usualmente devido à presença de ligações $-\text{C}-\text{H}$ ($-\text{C}-\text{H}$ alifática e aromática, $-\text{N}-\text{H}$ e $-\text{O}-\text{H}$), as quais são numerosas na estrutura do citrato de sildenafil; a ligação $-\text{N}-\text{H}$, por sua vez, está representada pela vibração de estiramento no comprimento de onda de 3300 cm^{-1} (6) (BADWAN *et al.*, 2001; MELNIKOV *et al.*, 2003). Portanto, a identidade molecular da amostra é semelhante à do padrão.

4.1.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)

As Figuras 10 e 11 apresentam os termogramas obtidos por DSC para o citrato de sildenafil padrão e amostra, respectivamente.

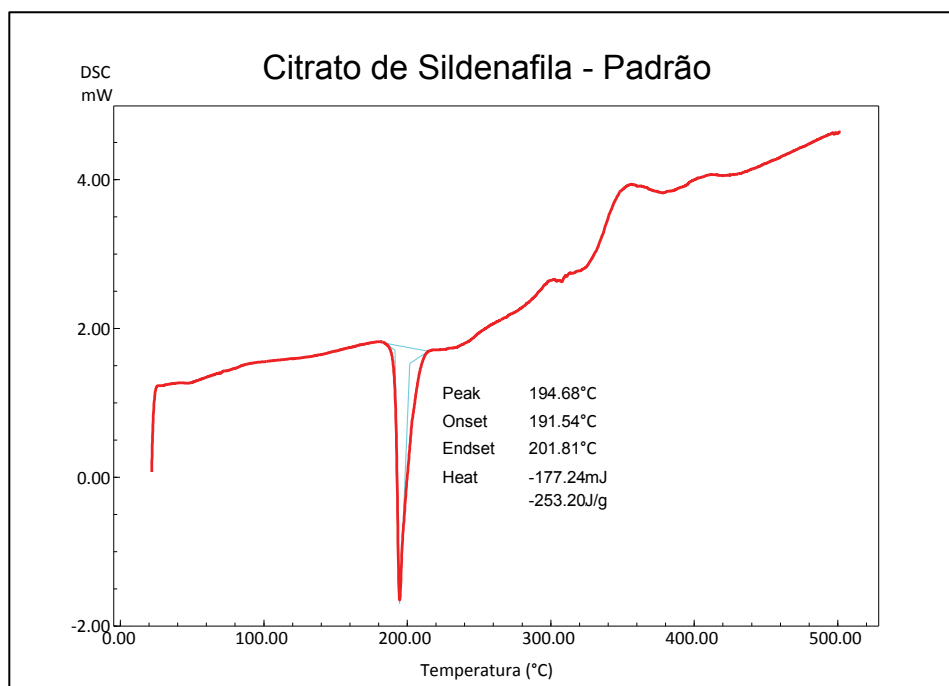


Figura 10. Termograma do citrato de sildenafil padrão obtido por DSC.

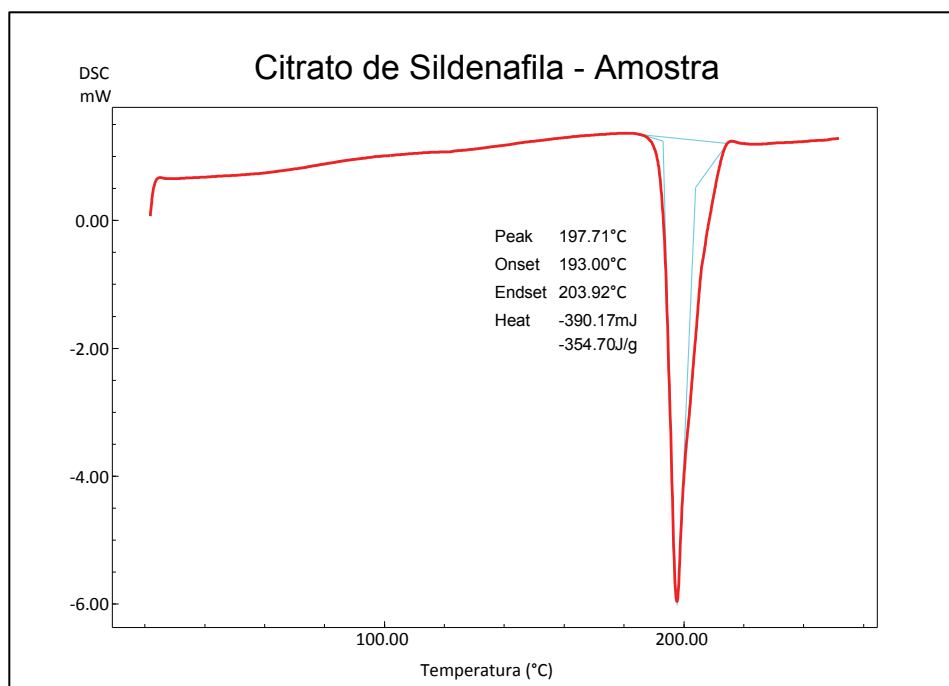


Figura 11. Termograma do citrato de sildenafil amostra obtido por DSC.

Em ambos os termogramas, foi observado o pico endotérmico em torno de 190°C, correspondente à fusão da molécula. Badwan e colaboradores (2001) também observaram esse comportamento endotérmico e atribuíram o mesmo à fusão do citrato de sildenafil, com pico máximo em 199,36°C, valor próximo aos observados nesse estudo: 194,68°C para o citrato de sildenafil padrão e 197,71°C para o citrato de sildenafil amostra.

As Figuras 12 e 13 apresentam os termogramas obtidos por TGA e mostram a decomposição da molécula em 211,38°C e 216,17°C para o citrato de sildenafil padrão e o citrato de sildenafil amostra, respectivamente. Essa ausência de perda de massa antes de 200°C indica a natureza anidra da amostra (BADWAN *et al.*, 2001).

O comportamento térmico do citrato de sildenafil padrão e do citrato de sildenafil amostra foram similares. A porcentagem da primeira perda de massa observada em torno de 210°C, correspondente à decomposição da molécula, ficou em torno de 20%. Em seguida, uma nova perda de aproximadamente 50% da massa do composto ocorreu em torno de 310°C, provavelmente relacionada à incineração do composto, que é seguida da ignição após 600°C (MELKINOV *et al.*, 2003). Esse mesmo comportamento térmico foi observado por Badwan e colaboradores (2001) e Melkinov e colaboradores (2003).

De acordo com a temperatura de decomposição e a porcentagem da primeira perda de massa observadas para o citrato de sildenafil, Melkinov e colaboradores (2003) sugeriram que inicialmente o composto sofre uma dissociação e depois tem sua parte aniônica decomposta, uma vez que a temperatura de decomposição observada para o citrato de sildenafil coincide com àquela para a decomposição do ácido cítrico e, ainda, a porcentagem de massa perdida é equivalente àquela calculada para a eliminação do íon citrato do complexo.

Desta forma, pode-se concluir que a amostra analisada é o citrato de sildenafil.

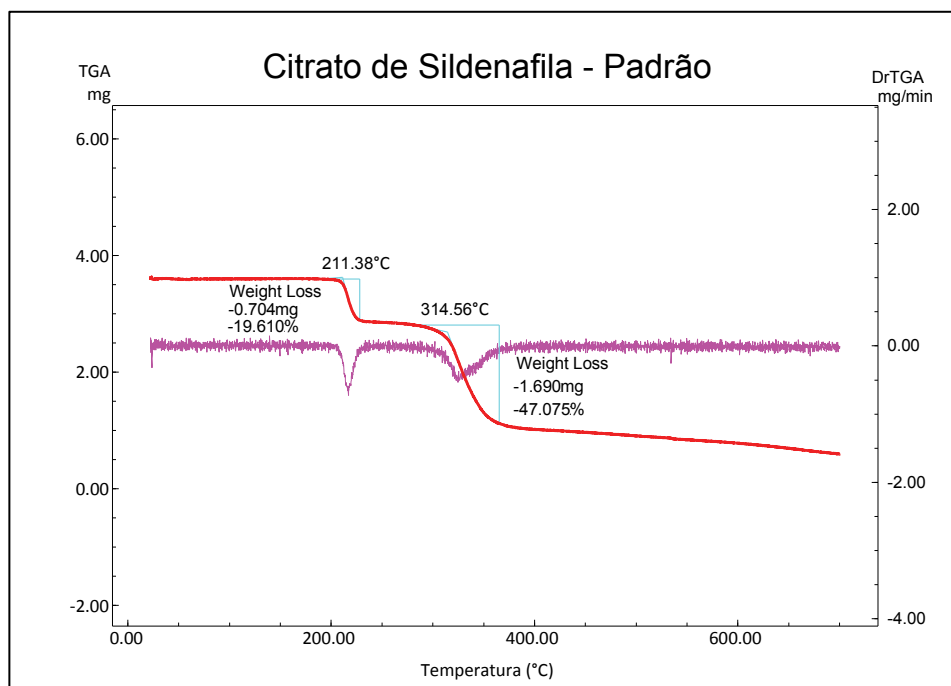


Figura 12. Termograma do citrato de sildenafil padrão obtido por TGA.

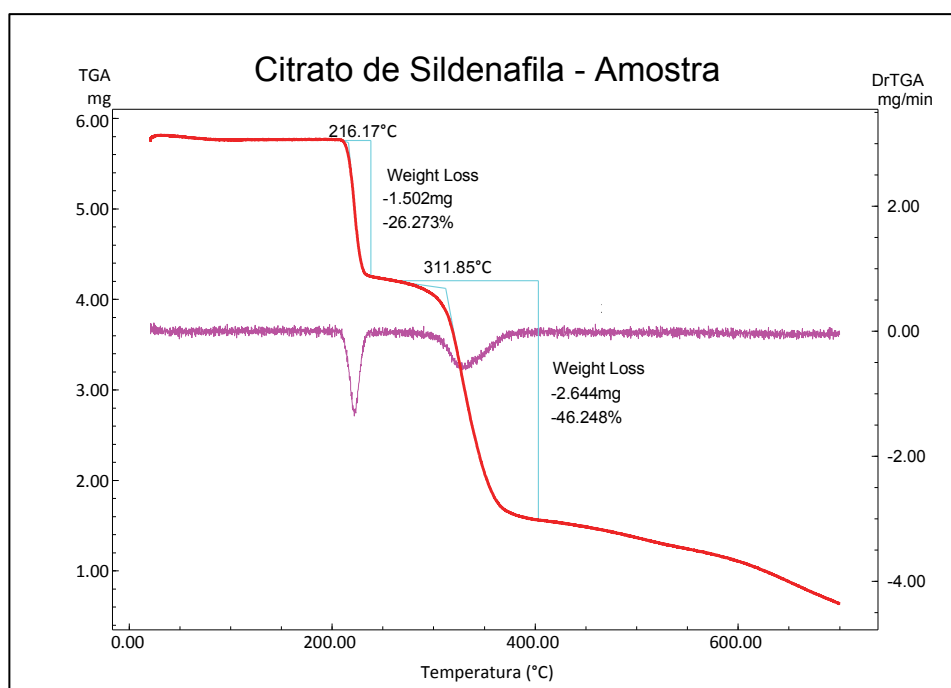


Figura 13. Termograma do citrato de sildenafil amostra obtido por TGA.

4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITRATO DE SILDENAFILA POR CLAE

A validação de um método analítico é uma avaliação capaz de garantir que um método gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra (RIBANI *et al.*, 2004) e que essa metodologia analítica seja precisa, específica, reprodutível e robusta para o intervalo específico no qual o analito será analisado (SHABIR, 2003).

Foi realizada a validação da metodologia analítica para quantificação de citrato de sildenafil por CLAE e os resultados estão descritos abaixo.

4.2.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade avaliam o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na amostra; dessa forma, garantem que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Nas Figuras 14, 15, 16 e 17 estão apresentados os cromatogramas do citrato de sildenafil padrão em fase móvel (14) e das formulações em estudo: SEDDS 1 – placebo (15a), SEDDS 1 contendo citrato de sildenafil (15b), SEDDS 2 – placebo (16a), SEDDS 2 contendo citrato de sildenafil (16b), solução em 2-pirrolidona (SSP) placebo (17a) e solução SSP contendo citrato de sildenafil (17b).

A seletividade do método pode ser observada tanto pela ausência do pico do fármaco nas amostras de placebo nos cromatogramas “15a”, “16a” e “17a” quanto pela presença do pico correspondente ao citrato de sildenafil na presença dos constituintes da formulação nos cromatogramas “15b”, “16b” e “17b”. Além disso, a presença dos constituintes das formulações não interferiu no tempo de retenção do citrato de sildenafil nos SEDDS e na solução, quando comparado à análise do citrato de sildenafil padrão em fase móvel.

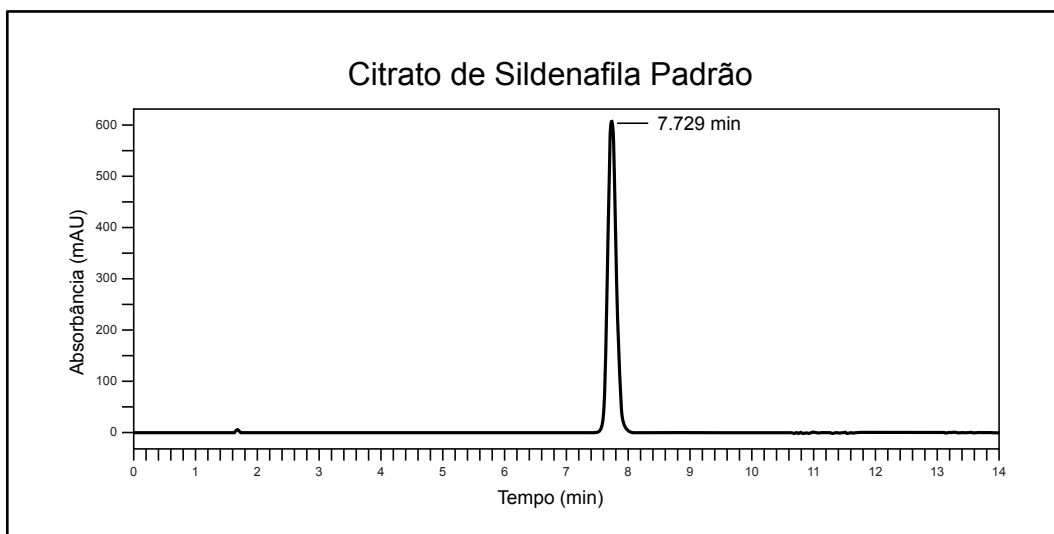


Figura 14. Cromatograma do citrato de sildenafil padrão em fase móvel.

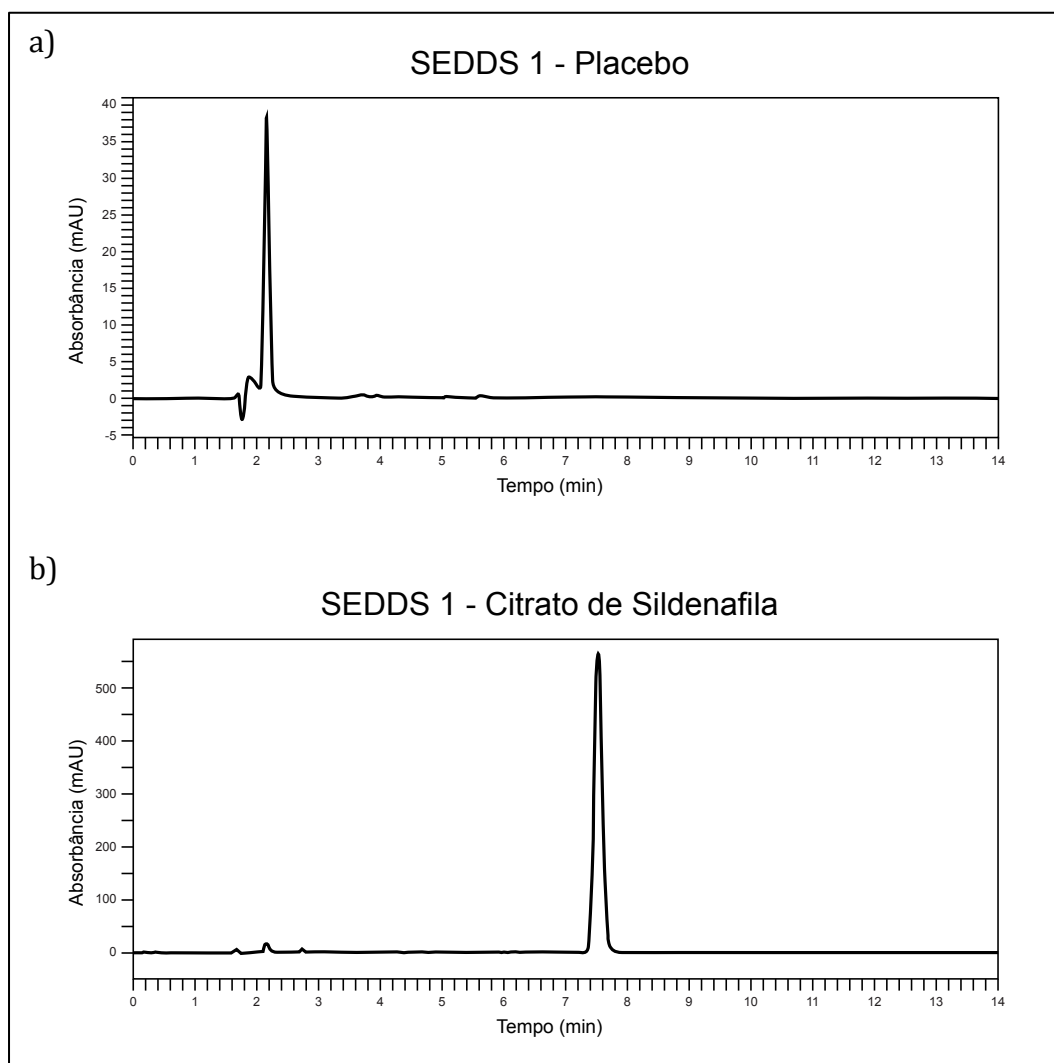


Figura 15. Cromatogramas dos SEDDS 1 placebo (a) e SEDDS 1 contendo citrato de sildenafil (b).

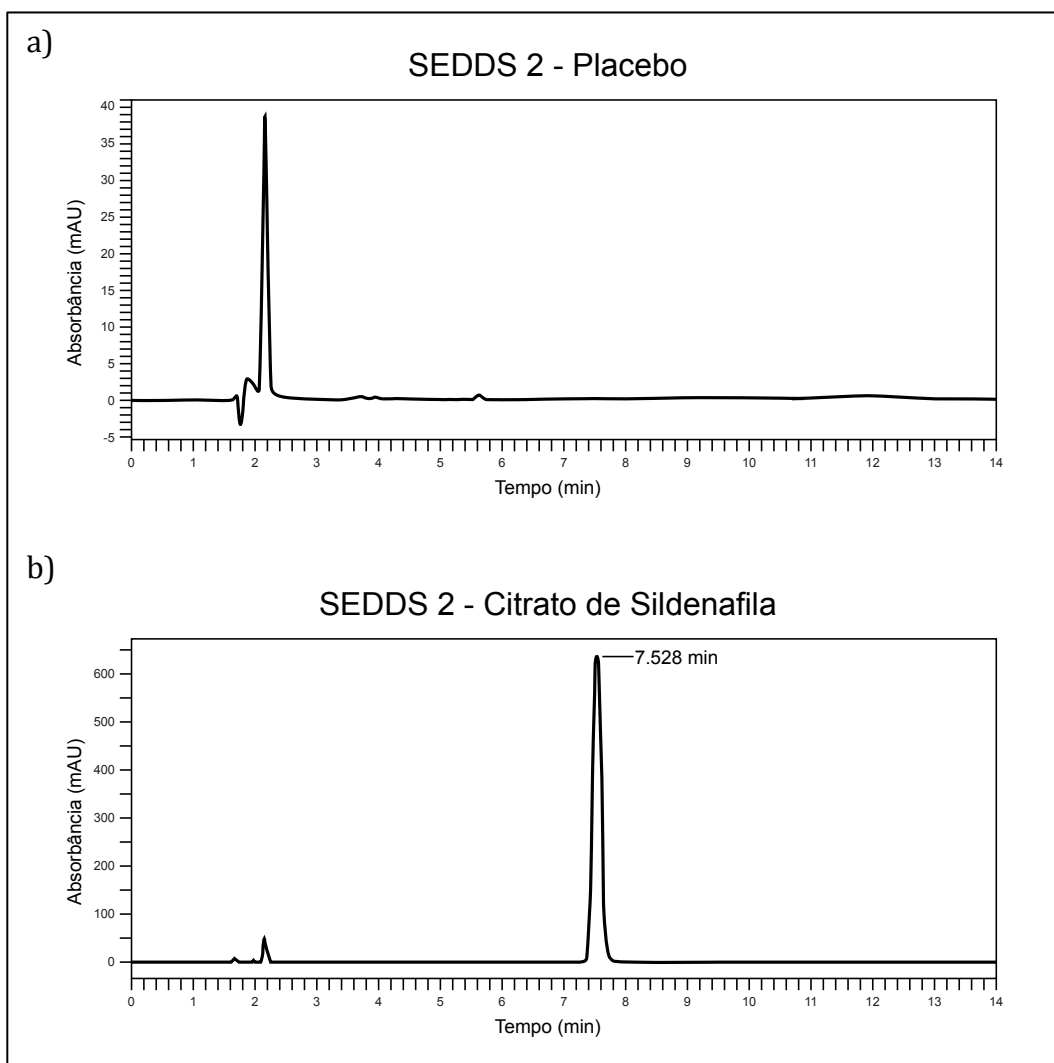


Figura 16. Cromatogramas do SEDDS 2 placebo (a) e SEDDS 2 contendo citrato de sildenafil (b).

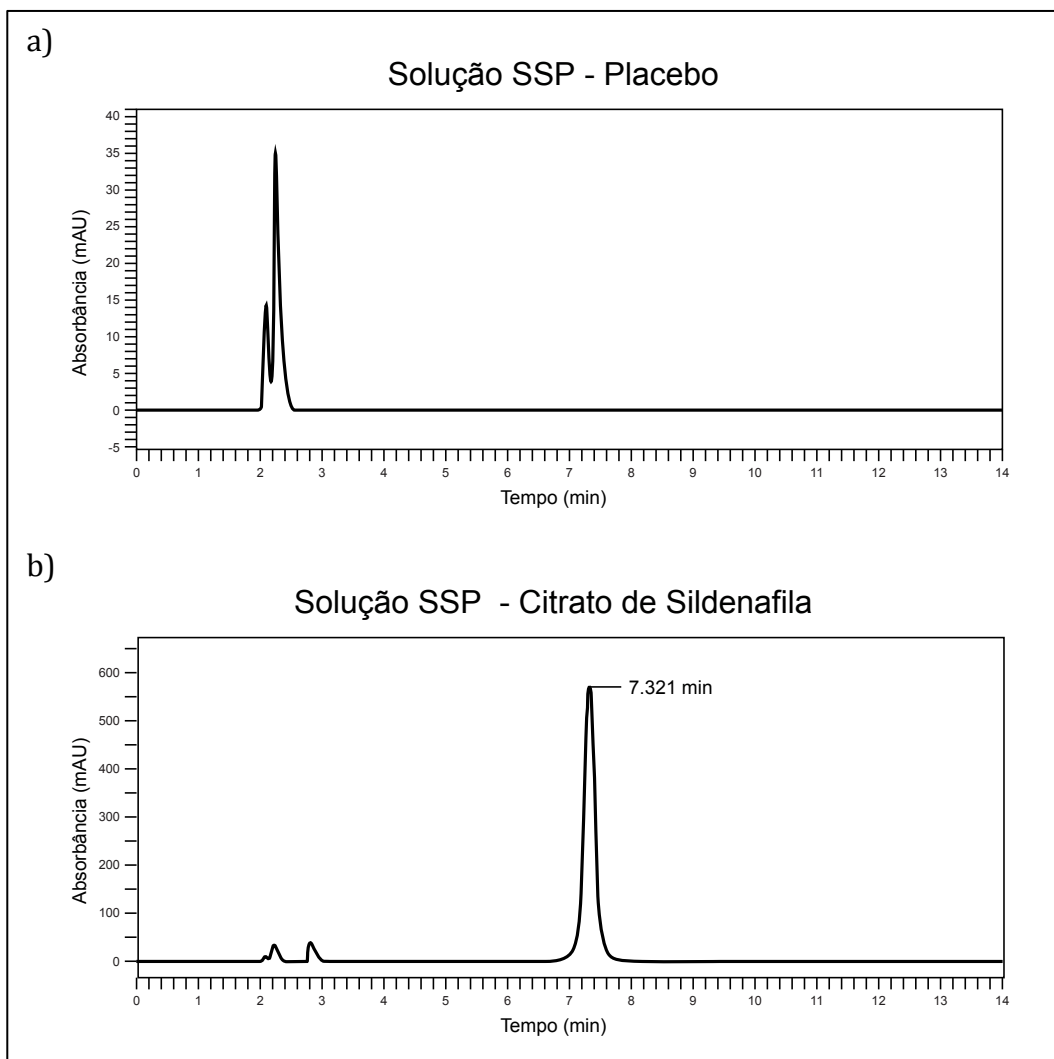


Figura 17. Cromatogramas da solução SSP placebo (a) e da solução SSP contendo citrato de sildenafil (b).

4.2.2 Linearidade

A relação matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da amostra a ser quantificada é comumente expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). As curvas analíticas obtidas em três dias de análise estão apresentadas na Figura 18.

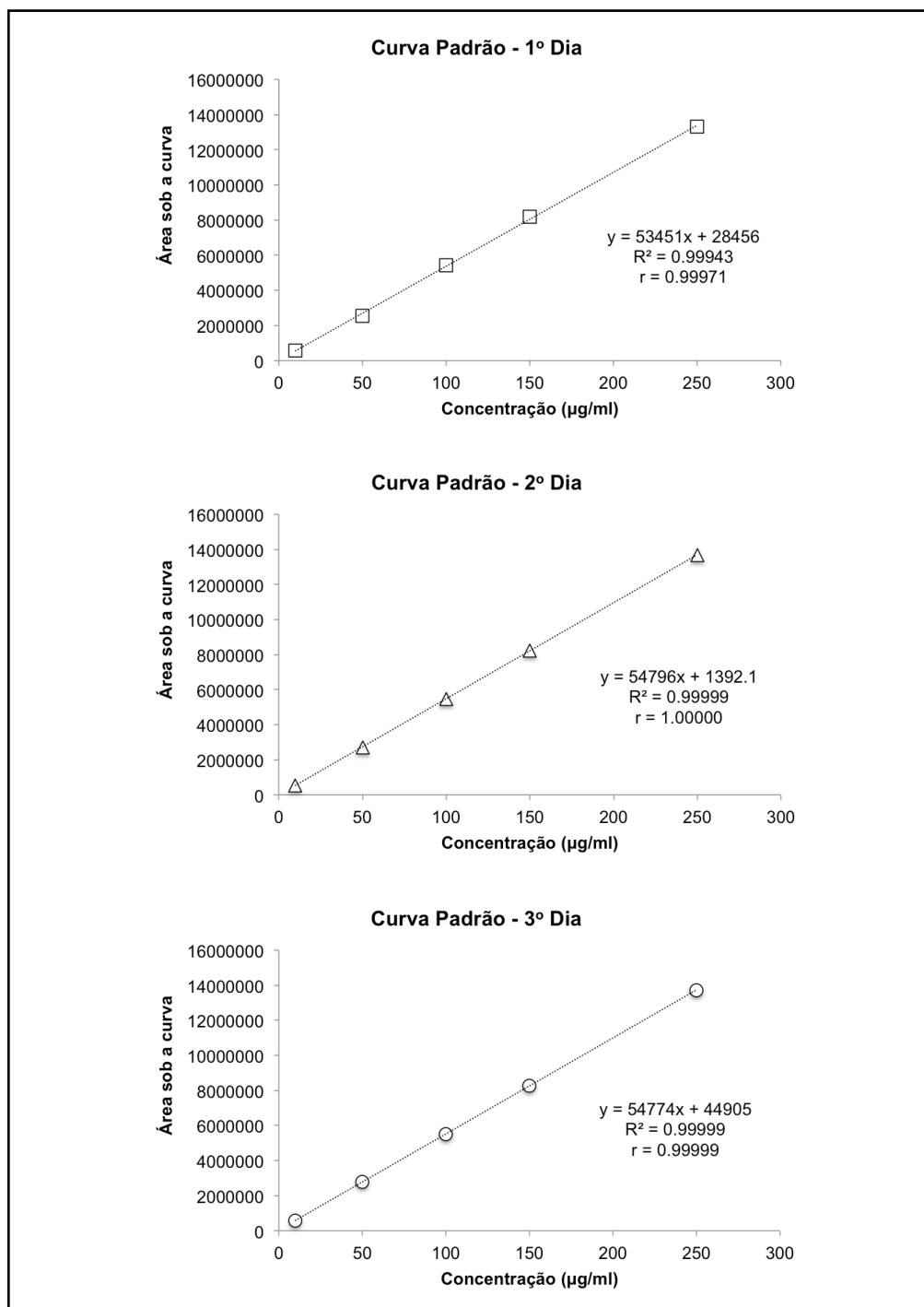


Figura 18. Curvas analíticas do citrato de sildenafil.

Foi realizada a análise de regressão linear das curvas analíticas obtidas com o objetivo de se estimar os coeficientes da curva analítica, como os coeficientes de regressão “a” e “b” e o coeficiente de correlação (r) (RIBANI *et al.*, 2004). Na Tabela 2, estão apresentados os dados obtidos após a análise de regressão linear das curvas analíticas do citrato de sildenafil.

Tabela 2. Análise de regressão linear das curvas analíticas.

Concentração (µg/ml)	CURVA 1 Área sob o pico	CURVA 2 Área sob o pico	CURVA 3 Área sob o pico
10,00	571714,16	552009,53	575144,1
	573478,59	554348,34	572118,98
	599213,3	551930,41	577414,72
49,98	2554152,32	2722445,52	2801888,53
	2549626,04	2716303,2	2801842,27
	2553284,3	2723068,16	2802703,59
99,97	5442471,23	5484467,46	5512961,8
	5443750,56	5487948,25	5507476,8
	5434271,23	5483673,6	5510540,31
149,95	8196953,62	8233639,95	8284541,77
	8183091,36	8235424,98	8278813,23
	8195288,13	8250104,35	8267842,77
249,92	13301985,33	13684827,7	13726124,48
	13302088,44	13690248,9	13715887,52
	13294171,16	13678004,6	13729141,3
Coefficiente angular (b)	53491,20731	54790,30612	54790,48126
Coefficiente linear (a)	24357,35271	927,4211468	45561,92596
Coefficiente de determinação (R²)	0,99943	0,99999	0,99999
Coefficiente de correlação (r)	0,99971	1,00000	0,99999

A linearidade foi comprovada pela obtenção do coeficiente de correlação (r) superior a 0,99, conforme preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003). Os coeficientes de correlação obtidos nas três curvas apresentadas (0,99971; 1,00000 e 0,99999) fornecem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a

dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

4.2.3 Precisão

Foram determinadas a precisão intra-dia e a precisão inter-dia da metodologia analítica empregada. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 . Determinação da precisão intra-dia e inter-dia do método analítico.

Replicatas	Dia 1			Dia 2			Inter-dia	
	Teor (%)	Média (%)	DPR	Teor (%)	Média (%)	DPR	Média (%)	DPR
1	98,28			100,69				
2	99,87			100,37				
3	101,15			103,56				
4	99,42	99,40	1,04	109,82	102,71	4,1	101,06	3,3
5	98,56			104,08				
6	99,14			97,72				

DPR: desvio padrão relativo

A precisão intra-dia indica a repetibilidade do método e representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição; a precisão inter-dia, por sua vez, também denominada de precisão intermediária, indica o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.*, 2004).

Os resultados da análise de precisão são indicados pela determinação do desvio padrão relativo (DPR). Conforme observado na Tabela 3, tanto a precisão intra-dia quanto a precisão inter-dia foram satisfatórias, uma vez que os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%, estando de acordo com a determinação da ANVISA (ANVISA, 2003). Dessa forma, pode-se considerar o método analítico preciso, com boa repetibilidade.

4.2.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados a partir das curvas de calibração. Os resultados obtidos foram de LD = 1,222 µg/ml e LQ = 4,107 µg/ml. Considerando a concentração de trabalho de 100 µg/ml, os valores encontrados demonstram que o método tem sensibilidade adequada para as análises de quantificação a serem realizadas nesse estudo.

4.2.5 Exatidão

A exatidão foi calculada pela porcentagem de recuperação do fármaco, considerando a análise em três níveis de concentração. Na Tabela 4, estão apresentados os valores de concentração do citrato de sildenafila obtidos para o placebo contaminado (Concentração da Amostra), os quais foram comparados com os valores obtidos na análise da solução de citrato de sildenafila padrão (Concentração Padrão de Referência) para a determinação da porcentagem de fármaco recuperado (% Recuperada). A média de recuperação e o DPR também estão apresentados a seguir.

Tabela 4. Resultados da porcentagem de recuperação para análise da exatidão do método analítico.

Nível	Concentração da Amostra (µg/ml)	Concentração Padrão Teórica (µg/ml)	% Recuperada	Média de Recuperação (%)	DPR (%)
80%	80,4766	80,4288	100,06	99,9652	0,0820
	79,9155	79,9744	99,93		
	79,9024	79,9744	99,91		
100%	101,2467	101,1429	100,10	101,1966	0,9639
	102,0917	100,5714	101,51		
	102,5583	100,5714	101,98		
120%	122,9873	120,6432	101,94	101,7940	0,2733
	122,3200	119,9616	101,97		
	121,7288	119,9616	101,47		

DPR: desvio padrão relativo

O método apresentou boa recuperação, com valores dentro do limite aceitável de 98,0 a 102,0%, com DPR abaixo de 2%, demonstrando que o método é capaz de medir com exatidão o fármaco dentro do intervalo de concentração considerado no estudo.

4.2.6 Robustez

A robustez do método foi determinada a partir da análise de uma solução de 100 µg/ml de citrato de sildenafil padrão de trabalho após variações das condições cromatográficas relacionadas ao fluxo da fase móvel, à temperatura e à proporção de solução tampão e acetonitrila na fase móvel, conforme descrito anteriormente na metodologia deste trabalho. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da análise de robustez do método analítico.

Variação de Parâmetro Cromatográfico		Teor (%)	Tempo de Retenção (min)	Assimetria
Fluxo	1,1 ml/min	98,3	6,99	1,09
		98,44	6,97	1,09
		97,58	6,97	1,09
Fluxo	0,9 ml/min	98,26	8,46	1,09
		98,49	8,46	1,07
		97,78	8,46	1,07
Temperatura	40°C	99,78	7,71	1,08
		98,26	7,73	1,06
		97,32	7,69	1,07
Fase Móvel	45:55 (aquosa: orgânica)	97,97	5,87	1,1
		98,1	5,86	1,1
		99,25	5,84	1,1
Média		98,294167		
DPR		0,6775284		

DPR: desvio padrão relativo

Na determinação do teor da solução padrão de trabalho frente às variações das condições cromatográficas, foram obtidos um baixo valor de DPR, demonstrando a robustez do método escolhido. No ensaio de robustez, também foi avaliada a assimetria dos picos; os valores de assimetria próximos de 1, obtidos nessa análise, indicam a simetria dos picos nas diferentes condições aplicadas.

4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.3.1 Preparo e Caracterização das Soluções

Para a racionalização da quantidade de gotas a serem administradas, visando-se atingir as dosagens usualmente empregadas, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de sildenafil (3,3%, 5,0% e 7,5% m/v) (DE PAULA, 2010). A Tabela 6 apresenta a correlação da dosagem usual de sildenafil para a disfunção erétil e a quantidade de gotas a ser administrada para cada concentração escolhida.

Tabela 6. Correlação da dosagem usual de citrato de sildenafil com a quantidade de gotas das soluções propostas.

DOSAGEM USUAL DISPONÍVEL	SOLUÇÃO DE SILDENAFILA		
	7,5%	5%	3,3%
25 mg	7 gotas	10 gotas	15 gotas
50 mg	14 gotas	20 gotas	30 gotas
100 mg	27 gotas	40 gotas	60 gotas

As soluções de citrato de sildenafil foram preparadas com variações na concentração de sildenafil (3,5% 5,0% e 7,5%) e na quantidade de 2-pirrolidona (10 ml, 20 ml e 30 ml). Em resumo, a Tabela 7 apresenta as concentrações de cada componente das soluções propostas.

Tabela 7. Composição das soluções de citrato de sildenafil preparadas.

COMPONENTES DAS SOLUÇÕES	CONCENTRAÇÃO DE SILDENAFILA DAS SOLUÇÕES		
	7,5%	5%	3,3%
Citrato de Sildenafil	4,2 g	2,8 g	1,85 g
2-pirrolidona	10 ml	10 ml	10 ml
	20 ml	20 ml	20 ml
	30 ml	30 ml	30 ml
Sacarina	0,1%	0,1%	0,1%
Metabissulfito de sódio	0,1%	0,1%	0,1%
Água destilada	qsp 40 ml	qsp 40 ml	qsp 40 ml

Logo após o preparo, com o resfriamento das soluções à temperatura ambiente, foi observada a formação de precipitado nas soluções com concentrações de 5,0% e 7,5% de sildenafil, independentemente da quantidade de 2-pirrolidona utilizada. Essas formulações foram, portanto, desconsideradas e descartadas do estudo.

As soluções com concentração de 3,3% de sildenafil, por sua vez, mostraram-se inicialmente estáveis, porém a solução a 3,3% preparada com apenas 10 ml de 2-pirrolidona também apresentou problema na solubilidade do citrato de sildenafil após aproximadamente um mês, indicando a provável necessidade de uma maior quantidade de solvente orgânico para a solubilização do fármaco.

Assim, considerando a baixa solubilidade do fármaco em água e a necessidade de se escolher apenas uma solução para a comparação com os SEDDS, proposta principal deste trabalho, foi selecionada a solução de sildenafil a 3,3% contendo 30 ml de 2-pirrolidona, minimizando os riscos referentes à estabilidade física da solução. A solução escolhida contém, ainda, sacarina como edulcorante e metabissulfito de sódio como antioxidante.

De acordo com os resultados observados, esta solução contém a máxima quantidade de fármaco (3,3%) que foi capaz de solubilizar imediatamente, sem apresentar evidência de recristalização após um curto período de tempo. A utilização de um solvente orgânico objetivou otimizar a solubilização do citrato de sildenafil, que é um fármaco pouco solúvel em água.

A 2-pirrolidona, solvente escolhido para o preparo das soluções, é um solvente orgânico, miscível em água, prontamente biodegradável e com propriedades de solubilização, permitindo a solubilização de fármacos pouco solúveis em água, como o citrato de sildenafil. Além disso, a 2-pirrolidona não apresenta atividade mutagênica ou genotóxica, tem uma DL50 oral em ratos de 5000 mg/kg e mostra um baixo risco ambiental, sugerindo que a 2-pirrolidona possa ser um bom solvente para o problema de lipofilicidade de grande parte dos fármacos, dificultando o preparo de formulações farmacêuticas com esses ativos. Mesmo com as vantagens apresentadas e já sendo utilizada em microemulsões parenterais para uso veterinário, a 2-pirrolidona ainda não tem sido utilizada em preparações farmacêuticas disponíveis comercialmente e o seu potencial como adjuvante no preparo dessas novas formas farmacêuticas deve ser explorado (JAIN; YALKOWSKY, 2007; DATE; NAGARSENKER, 2008).

Neste trabalho, o uso da 2-pirrolidona em uma solução com 75% desse solvente permitiu a solubilização de até 3,3% de sildenafil, o que não é possível em meio aquoso. Esta solução foi denominada de solução de sildenafil 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%) e sua caracterização foi realizada pela determinação de teor, pH e avaliação do aspecto visual. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 e serão utilizados para a avaliação dessa amostra durante o estudo de estabilidade.

Tabela 8. Caracterização da solução de sildenafil a 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%).

Amostra	Aspecto Visual	pH	Teor (%)
Solução Placebo	Límpida, incolor	5,32 ± 0,02	N/A
Solução de Sildenafil 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%)	Límpida, incolor	5,80 ± 0,02	98,98 ± 0,90

N/A: não se aplica

4.3.2 Preparo e Caracterização dos Sistemas Autoemulsionantes de Liberação de Fármaco (SEDDS)

4.3.2.1 Construção do Diagrama Pseudoternário de Fases

O diagrama pseudoternário de fases de sistemas contendo óleo-surfactante-água permite a identificação das regiões características de microemulsões, micelas, emulsões e de soluções isotrópicas límpidas, como os SEDDS, ou dispersões oleosas (CONSTANTINIDES, 1995).

Neste trabalho, o diagrama pseudoternário de fases foi construído de modo que em um vértice do triângulo está representada a mistura dos tensoativos na proporção 1:1; no segundo vértice, está representada a mistura do solvente e do cossolvente, na proporção 8:1; e no último vértice representou-se a água (NANDI; BARI; JOSHI, 2003).

Conforme anteriormente descrito na metodologia de preparo dos SEDDS, a fase orgânica é composta de 2-pirrolidona e isobutanol e foram estudadas duas misturas diferentes de tensoativos: Tween®80:Span®20 e Tween®80:Span®80, para a obtenção de duas amostras de SEDDS, denominadas SEDDS 1 e SEDDS 2, respectivamente. A Figura 19 apresenta o diagrama de fase referente ao SEDDS 1 e a Figura 20 apresenta o diagrama de fase referente ao SEDDS 2.

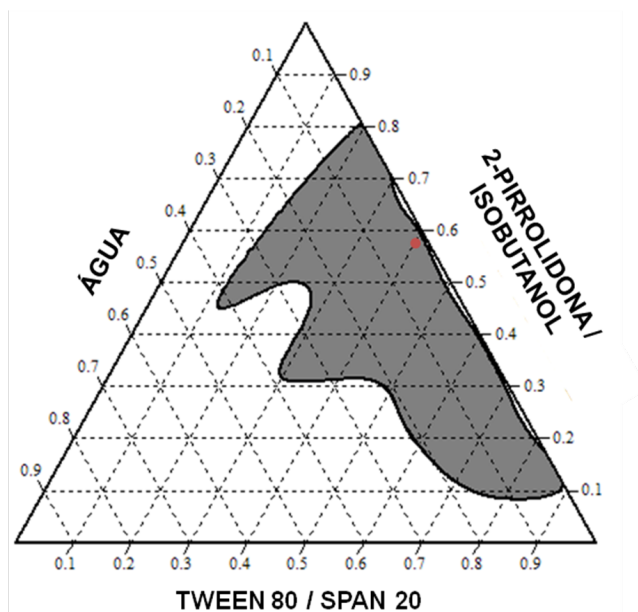


Figura 19. Diagrama pseudoternário de fase do SEDDS 1.

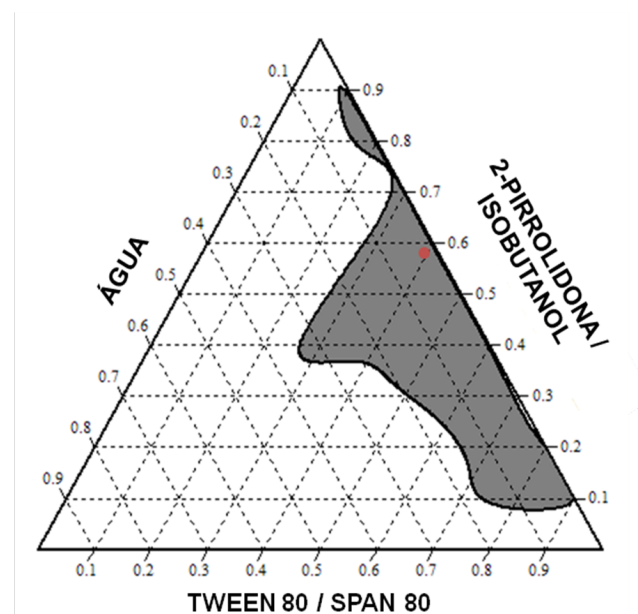


Figura 20. Diagrama pseudoternário de fase do SEDDS 2.

Nas figuras acima, a área em cinza escuro corresponde à área de formação de sistemas microemulsionados, indicando que foi possível obter algumas emulsões estáveis quando a água era adicionada pelo método de titulação descrito anteriormente. Os pontos vermelhos, marcados nas Figuras 19 e 20, representam as formulações SEDDS 1 e SEDDS 2, respectivamente, que foram escolhidas com base na proporção dos seus componentes. Essas áreas selecionadas estão de acordo com a área correspondente aos

sistemas autoemulsionantes de liberação de fármacos (SEDDS), apresentada no diagrama pseudoternário de fases hipotético proposto por Constantinides (1995).

A construção do diagrama pseudoternário, portanto, permitiu a comparação dos diferentes surfactantes e sua sinergia com os cossolventes e cossurfactantes (KOHLI *et al.*, 2010), contribuindo desta forma para a otimização das concentrações da fase orgânica e dos surfactante e cossurfactante selecionados e para a definição dos SEDDS que serão empregados para a incorporação do citrato de sildenafil neste trabalho.

4.3.2.2 Preparo dos SEDDS

De acordo com os resultados obtidos com a construção dos diagramas pseudoternário de fases, foram definidas as formulações das duas amostras de SEDDS: SEDDS 1 e SEDDS 2, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Composição dos sistemas autoemulsionantes SEDDS 1 e SEDDS 2.

Componentes		SEDDS 1	SEDDS 2
Fase oleosa	2-pirrolidona	52%	52%
	Isobutanol	6%	6%
Mistura de Tensoativos	Tween [®] 80	20%	20%
	Span [®] 20	20%	-
	Span [®] 80	-	20%
	Água	2%	2%

Ambos os sistemas são constituídos de uma fase orgânica contendo 52% de 2-pirrolidona como solvente e 6% de isobutanol como cossolvente, além de 40% de uma mistura de tensoativos: Tween[®]80 e Span[®]20 (SEDDS 1) ou Tween[®]80 e Span[®]80 (SEDDS 2), e 2% de água.

A 2-pirrolidona foi o solvente orgânico escolhido tanto para a solução quanto para os SEDDS e suas principais características foram anteriormente apresentadas e discutidas no item 4.3.1. O uso do isobutanol, da mistura dos surfactantes e suas proporções foram baseados no estudo de Nandi; Bari; Joshi (2003), que avaliaram os efeitos de álcoois alifáticos e surfactantes na formação de sistemas microemulsionados.

Os álcoois com cadeias de carbono mais longas, como isopropanol, isobutanol e isopentanol, facilitam a formação da microemulsão; além disso, com concentrações maiores dos álcoois, consegue-se uma melhor incorporação de água para formar a microemulsão (NANDI; BARI; JOSHI, 2003). Com relação à sua toxicidade, alguns álcoois com cadeias longas de carbono são usualmente encontrados em bebidas alcoólicas e utilizados como agentes flavorizantes em concentrações que não implicam em preocupação com relação à sua segurança toxicológica, tendo em vista que a DL50 oral do isobutanol em ratos é de 2460 mg/kg (LACHENMEIER; HAUPT; SCHULZ, 2008). A utilização do isobutanol nos SEDDS tem grande relevância para a aplicabilidade deste tipo de sistema de liberação de fármacos e não parece ter toxicidade significativa nas concentrações presentes nas formulações propostas a serem administradas aos pacientes.

Por sua vez, os surfactantes escolhidos foram os do tipo não-iônico, que são geralmente indicados para aplicações farmacêuticas e formulações microemulsionadas por serem menos tóxicos e menos afetados por mudanças de pH e forças iônicas (CONSTANTINIDES, 1995). Por exemplo, o Tween®80 é amplamente utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos devido ao seu baixo custo e baixa toxicidade, apresentando DL50 intravenosa em camundongos maior que 1800 mg/kg (SIMÕES *et al.*, 2005).

Além disso, os surfactantes não-iônicos podem melhorar a solubilidade do fármaco, assim como reduzir a tensão interfacial de superfície e melhorar a penetração do fármaco pelas células epiteliais (BAEK *et al.*, 2013). Ao manter o fármaco solubilizado por um tempo prolongado no local da absorção, o SEDDS permite uma absorção mais eficaz e previne a precipitação do fármaco no lúmen (SHAH *et al.*, 1994; KOHLI *et al.*, 2010).

Após a obtenção dos SEDDS, foram preparadas novas amostras para a inclusão do citrato de sildenafil. Foram preparados SEDDS contendo sildenafil nas concentrações de 1,3% (SEDDS 1A e SEDDS 2A) e 3,3% (SEDDS 1B e SEDDS 2B), totalizando quatro amostras diferentes, além dos placebos, para caracterização e avaliação da estabilidade. A concentração de 1,3% de sildenafil corresponde àquela em que o fármaco prontamente se solubilizou nos SEDDS e a concentração de 3,3% está próxima à saturação, necessitando de agitação por cerca de 12 horas para garantir a completa solubilização do fármaco. A incorporação de 3,3% de sildenafil foi escolhida

para que os SEDDS (SEDDS 1B e SEDDS 2B) e a solução (SSP 3,3%) contivessem a mesma concentração do fármaco.

4.3.2.3 Caracterização dos SEDDS

As amostras de SEDDS foram caracterizadas quanto à condutividade, índice de refração, teor e aspecto visual. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados da caracterização dos SEDDS.

Amostra	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Índice de Refração	Teor (%)	Aspecto Visual
SEDDS 1 (Placebo)	5,67 ± 0,06	1,47 ± 0,00	N/A	Transparente, amarelo
SEDDS 2 (Placebo)	4,37 ± 0,06	1,47 ± 0,00	N/A	Transparente, amarelo
SEDDS 1A (1,3%)	7,00 ± 0,10	1,47 ± 0,00	96,07 ± 1,64	Transparente, amarelo
SEDDS 1B (3,3%)	7,53 ± 0,05	1,47 ± 0,00	94,54 ± 0,79	Transparente, amarelo
SEDDS 2A (1,3%)	6,33 ± 0,15	1,47 ± 0,00	99,59 ± 1,58	Transparente, amarelo
SEDDS 2B (3,3%)	7,23 ± 0,05	1,47 ± 0,00	94,56 ± 2,13	Transparente, amarelo

n = 3, média ± desvio padrão; N/A: não se aplica

A determinação da condutividade elétrica e do índice de refração dos SEDDS fornecem informações relacionadas ao tipo de sistema que está sendo obtido e contribuem para a avaliação da estabilidade dessas formulações.

A medida de condutividade, por exemplo, permite a determinação do tipo de microemulsão formada; se os valores medidos para esses sistemas forem mais próximos do valor medido para a água, pode-se classificar o sistema como óleo em água – O/A, e se

os valores forem próximos aos da fase oleosa, o sistema poderá ser classificado como água em óleo - A/O (LAWRENCE; REES, 2012). Neste caso, todos os SEDDS desenvolvidos apresentaram valores de condutividade próximos aos da fase oleosa, indicando a formação de preparações A/O. Além disso, a análise de condutividade elétrica mostrou que a adição do citrato de sildenafil, um fármaco na forma de sal, resultou no aumento da condutividade dos SEDDS. As amostras de SEDDS 1B e SEDDS 2B, contendo maior quantidade do fármaco, apresentaram valores de condutividade um pouco maiores do que as amostras do SEDDS 1A e SEDDS 2A, confirmando a influência da presença do fármaco na condutividade dos sistemas.

Com relação ao índice de refração, não foi observada diferença nos valores determinados para cada um dos sistemas de liberação preparados, tanto na ausência quanto na presença do citrato de sildenafil. O valor de 1,47, obtido para todas as amostras, é semelhante ao determinado para a 2-pirrolidona, principal solvente das preparações.

As amostras contendo citrato de sildenafil também foram avaliadas quanto ao teor de fármaco presente. Os SEDDS contendo 1,3% (SEDDS 1A e SEDDS 2A) apresentaram teores discretamente maiores do que os SEDDS contendo 3,3% (SEDDS 1B e SEDDS 2B), mas todas as amostras apresentaram teor em torno de 95%.

Os SEDDS mostraram-se límpidos, transparentes e amarelos, sem diferença significativa do aspecto visual entre as amostras preparadas. Na Figura 21, pode-se observar a coloração amarela dos SEDDS (SEDDS 1 e SEDDS 2) em comparação com a solução em 2-pirrolidona incolor (SSP 3,3%).

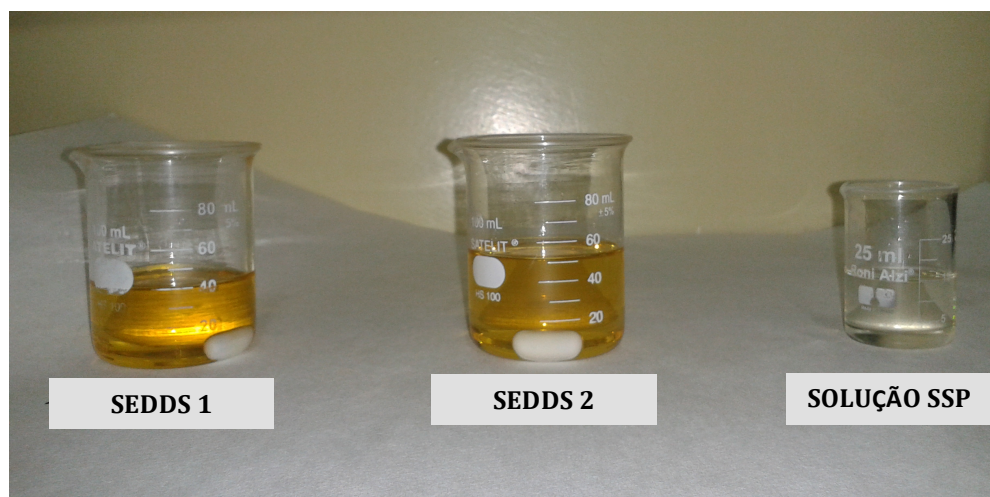


Figura 21. Amostras das formulações desenvolvidas: sistemas autoemulsionantes (SEDDS 1 e SEDDS 2) e solução em 2-pirrolidona.

Não foi possível determinar o tamanho de gotículas dos SEDDS, uma vez que nesse estado eles são considerados soluções isotrópicas oleosas e só formarão microemulsões com agitação moderada em meio aquoso (CONSTANTINIDES, 1995). Possivelmente, os SEDDS preparados se comportem como soluções micelares na ausência do meio aquoso, de modo que não é possível a detecção das gotículas e a repetibilidade dos resultados ao se realizar uma análise nessas amostras.

4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

4.4.1 Estudo de Estabilidade da Solução

A estabilidade da solução de citrato de sildenafil 3,3% em 2-pirrolidona (SSP 3,3%) foi estudada pela avaliação do pH e do aspecto visual e pela determinação do teor. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Estudo de estabilidade da solução de sildenafil.

Amostra		Tempo do Estudo				
		0	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Solução Placebo	pH	5,32 ± 0,02	5,43 ± 0,02	5,53 ± 0,01	5,55 ± 0,01	5,98 ± 0,02
Solução SSP 3,3%	pH	5,80 ± 0,02	5,83 ± 0,02	5,78 ± 0,03	5,80 ± 0,01	5,69 ± 0,01
	Teor (%)	98,98±0,90	95,21±1,80	93,31±1,89	86,37±0,12	86,57±0,12

n = 3, média ± desvio padrão

O pH da solução SSP 3,3% não sofreu alteração ao longo dos 90 dias de estudo, permanecendo aproximadamente o mesmo daquele observado para a solução placebo, assim como o aspecto visual das soluções SSP 3,3% e placebo, que permaneceram límpidas e incolores durante todo o tempo do estudo de estabilidade.

Por outro lado, observou-se uma variação do teor da solução SSP 3,3% durante o estudo; após 90 dias, houve um decaimento de aproximadamente 10% do teor inicialmente obtido para as amostras. Esse resultado sugere a necessidade de uma melhor avaliação do antioxidante escolhido para a formulação e, talvez, uma possível

substituição do metabissulfito de sódio por outro antioxidante que venha a fornecer uma melhor ação para o citrato de sildenafil na essa solução.

4.4.2 Estudo de Estabilidade dos SEDDS

Os SEDDS tiveram sua estabilidade avaliada pela determinação da condutividade, do índice de refração, do teor e pela avaliação do aspecto visual durante os 90 dias de estudo. Os resultados de cada análise estão apresentados nas tabelas abaixo.

A análise da condutividade ao longo do estudo de estabilidade acelerado mostrou que houve um aumento da condutividade em todos os SEDDS avaliados, inclusive nos SEDDS placebos. Com exceção do SEDDS 2A, todos os outros sistemas apresentaram um aumento mais significativo da condutividade após 60 dias (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação da condutividade dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.

Amostra	Tempo do Estudo de Estabilidade – Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)				
	0	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
SEDDS 1 (Placebo)	5,67 \pm 0,06	5,33 \pm 0,06	5,03 \pm 0,06	6,2 \pm 0,26	6,4 \pm 0,20
SEDDS 2 (Placebo)	4,37 \pm 0,06	3,77 \pm 0,23	3,40 \pm 0,10	8,07 \pm 0,21	8,70 \pm 0,20
SEDDS 1A (1,3%)	7,00 \pm 0,10	6,53 \pm 0,28	6,70 \pm 0,10	14,36 \pm 0,40	7,43 \pm 0,25
SEDDS 1B (3,3%)	7,53 \pm 0,05	7,4 \pm 0,17	7,43 \pm 0,15	12,60 \pm 0,20	10,63 \pm 0,35
SEDDS 2A (1,3%)	6,33 \pm 0,15	6,63 \pm 0,05	6,90 \pm 0,10	8,16 \pm 0,15	8,56 \pm 0,20
SEDDS 2B (3,3%)	7,23 \pm 0,05	7,63 \pm 0,50	7,56 \pm 0,15	10,13 \pm 0,1	22,03 \pm 0,20

n = 3, média \pm desvio padrão

O índice de refração das amostras de SEDDS não sofreu alteração ao longo dos 90 dias de estudo (Tabela 13). O valor de 1,47 foi observado tanto nos SEDDS placebos quanto nos SEDDS contendo citrato de sildenafil e, conforme já observado, é equivalente ao índice de refração da 2-pirrolidona, principal solvente utilizado.

Tabela 13. Avaliação do índice de refração dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.

Amostra	Tempo do Estudo de Estabilidade – Índice de Refração				
	0	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
SEDDS 1 (Placebo)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00
SEDDS 2 (Placebo)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,46 ± 0,01	1,46 ± 0,01
SEDDS 1A (1,3%)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,46 ± 0,01	1,47 ± 0,00
SEDDS 1B (3,3%)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00
SEDDS 2A (1,3%)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00
SEDDS 2B (3,3%)	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,47 ± 0,00

n = 3, média ± desvio padrão

Com relação à avaliação do comportamento do teor das amostras ao longo do estudo de estabilidade, foi possível observar um decaimento do teor em todas as amostras durante os 90 dias (Tabela 14).

As amostras de SEDDS contendo 1,3% de citrato de sildenafila (SEDDS 1A e SEDDS 2A) apresentaram um decaimento maior do que as amostras contendo 3,3% do fármaco (SEDDS 1B e SEDDS 2B), que por sua vez apresentaram um comportamento semelhante ao da solução SSP 3,3%, com um menor decaimento do teor. Embora tenham apresentado o mesmo decaimento de conteúdo do fármaco após 90 dias, é importante ressaltar que as amostras de SEDDS não continham antioxidante em sua composição, ao contrário da solução, que continha metabissulfito de sódio. Possivelmente, a inclusão de um antioxidante adequado nos SEDDS melhoraria a estabilidade dessas formulações com um menor decaimento do teor.

Tabela 14. Avaliação do teor dos SEDDS durante o estudo de estabilidade.

Amostra	Tempo do Estudo de Estabilidade - Determinação do Teor (%)				
	0	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
SEDDS 1A (1,3%)	96,07 ± 1,64	75,07 ± 1,94	72,55 ± 0,07	62,21 ± 0,33	63,76 ± 0,65
SEDDS 1B (3,3%)	94,54 ± 0,79	93,39 ± 1,78	86,40 ± 0,67	82,45 ± 0,38	83,77 ± 0,74
SEDDS 2A (1,3%)	99,59 ± 1,58	86,71 ± 2,80	77,54 ± 0,14	71,34 ± 0,27	70,39 ± 0,56
SEDDS 2B (3,3%)	94,56 ± 2,13	92,72 ± 2,95	88,45 ± 0,63	83,05 ± 0,30	83,49 ± 1,20

n = 3, média ± desvio padrão

Todas as formulações dos SEDDS preparadas também foram avaliadas quanto ao aspecto visual durante o estudo de estabilidade. Os SEDDS mantiveram-se límpidos, transparentes, amarelos, sem alterações como mudança de cor ou precipitação do fármaco.

De modo geral, pode-se considerar os SEDDS 1B e 2B e a solução SSP 3,3% estáveis e cabe avaliar a utilização de um antioxidante para reduzir o decaimento do teor observado em todas as amostras.

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS SEDDS NOS MEIOS DE LIBERAÇÃO

Os SEDDS 1 e SEDDS 2, placebos, foram submetidos aos meios de liberação de suco gástrico simulado (SGS) e suco entérico simulado (SES) visando mimetizar a passagem desses sistemas pelo trato gastrointestinal humano e verificar se o comportamento dessas formulações está de acordo com o esperado para esse tipo de sistema de liberação, ou seja, se esses sistemas apresentam a característica autoemulsionante e são capazes de formar a microemulsão O/A ao entrar em contato com o meio aquoso.

Para esse estudo, foram avaliados a condutividade, o tamanho de gotícula, o índice de polidispersividade (IP) das amostras antes e após o contato com os meios de liberação propostos. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Avaliação do comportamento dos SEDDS nos meios de liberação.

Amostra	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Tamanho médio de gotícula (nm)	Índice de Polidispersividade
SEDDS 1	7,20 \pm 0,10	N/D	N/D
SEDDS 2	7,03 \pm 0,15	N/D	N/D
SGS	> 200,00	N/D	N/D
SES	> 200,00	N/D	N/D
SEDDS1 (SGS)	> 200,00	224,65 \pm 48,29	0,47 \pm 0,13
SEDDS1 (SES)	> 200,00	264,60 \pm 24,89	0,44 \pm 0,05
SEDDS2 (SGS)	> 200,00	216,90 \pm 21,62	0,30 \pm 0,02
SEDDS2 (SES)	> 200,00	233,16 \pm 22,23	0,31 \pm 0,01

n = 3, média \pm desvio padrão; SGS: suco gástrico simulado; SES: suco entérico simulado; N/D: não determinado.

A formação de microemulsões O/A tanto a partir do SEDDS 1 quanto do SEDDS 2 nos meios SGS e SES pode ser comprovada pelos resultados de condutividade e tamanho de gotículas apresentados.

As amostras de SEDDS 1 e SEDDS 2 apresentaram condutividade baixa, diferentemente dos meios de liberação e dos SEDDS na presença dos meios, que apresentaram valores de condutividade acima do valor limite de detecção do equipamento utilizado, que é de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A avaliação da condutividade permite definir qual o tipo de microemulsão formada (O/A ou A/O), já que a água apresenta alta condutividade elétrica, diferentemente de componentes oleosos (CONSTANTINIDES, 1995; LAWRENCE; REES, 2012). Sendo assim, pode-se considerar que as microemulsões formadas a partir dos SEDDS analisados são do tipo O/A.

O tamanho de gotícula, que não havia sido possível ser determinado durante a caracterização dos SEDDS obtidos, foi determinado após o contato dos sistemas com os meios de liberação. Foram obtidos valores de tamanho de gotículas em torno de 250 nm para os dois SEDDS, conforme apresentado na tabela acima. De acordo com a nomenclatura sugerida por Kohli *et al.* (2010), SEDDS capazes de formar microemulsões

com tamanho de gotículas na faixa de 100 e 250 nm, como os obtidos nesse estudo, são considerados SMEDDS, ou seja, sistemas automicroemulsionantes de liberação de fármacos.

A análise do tamanho de gotícula também fornece valores de índice de polidispersividade (IP) para cada amostra analisada. O IP está relacionado com a distribuição, homogênea ou heterogênea, do tamanho de gotículas das amostras analisadas, de modo que em uma escala de 0 a 1, valores de IP menores do que 0,1 podem ser associados a um sistema monodisperso com alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição monomodal. Por outro lado, valores altos de IP sugerem uma distribuição mais ampla ou polimodal da amostra (GAUMET *et al.*, 2008). Conforme apresentado na Tabela 15, os valores de IP obtidos foram inferiores a 0,5, indicando sistemas com uma distribuição homogênea, mas podendo apresentar populações de diferentes tamanhos de gotículas na mesma amostra.

Por fim, cabe ressaltar a relevância do ensaio de avaliação do comportamento dos SEDDS nos meios de liberação, já que a partir dos resultados obtidos neste ensaio foi possível confirmar que os sistemas de liberação desenvolvidos são de fato do tipo autoemulsionantes, uma vez que após serem expostos ao meio aquoso sob agitação moderada foram capazes de formar finas emulsões O/A, com gotículas pequenas, conforme ocorre quando um SEDDS é administrado e a autoemulsificação ocorre *in vivo* graças à motilidade digestiva do estômago e do intestino (CHARMAN *et al.*, 1992; CONSTANTINIDES, 1995; POUTON, 1997; KOHLI *et al.*, 2010).

4.6 ENSAIO DE PERMEAÇÃO EM INTESTINO ISOLADO DE RATOS

O ensaio de permeação em intestino isolado de rato foi realizado com o objetivo de se avaliar a extensão da permeação do citrato de sildenafil das formulações desenvolvidas.

Para a realização desse estudo, foram selecionados a solução SSP 3,3% e o SEDDS 2B – 3,3%, preparado com a mistura de tensoativos Tween[®]80 e Span[®]80. O SEDDS 2 foi escolhido pela menor toxicidade do Span[®]80 quando comparado ao Span[®]20, conforme observaram, por exemplo, Noudeh e colaboradores (2009), que sugeriram uma preferência para o uso do Span[®]80 em preparações farmacêuticas.

A Figura 22 apresenta a curva de permeação em intestino isolado de rato, onde foram plotados os valores médios \pm desvio padrão das concentrações de sildenafil no compartimento receptor no tempo em minutos das amostras testadas.

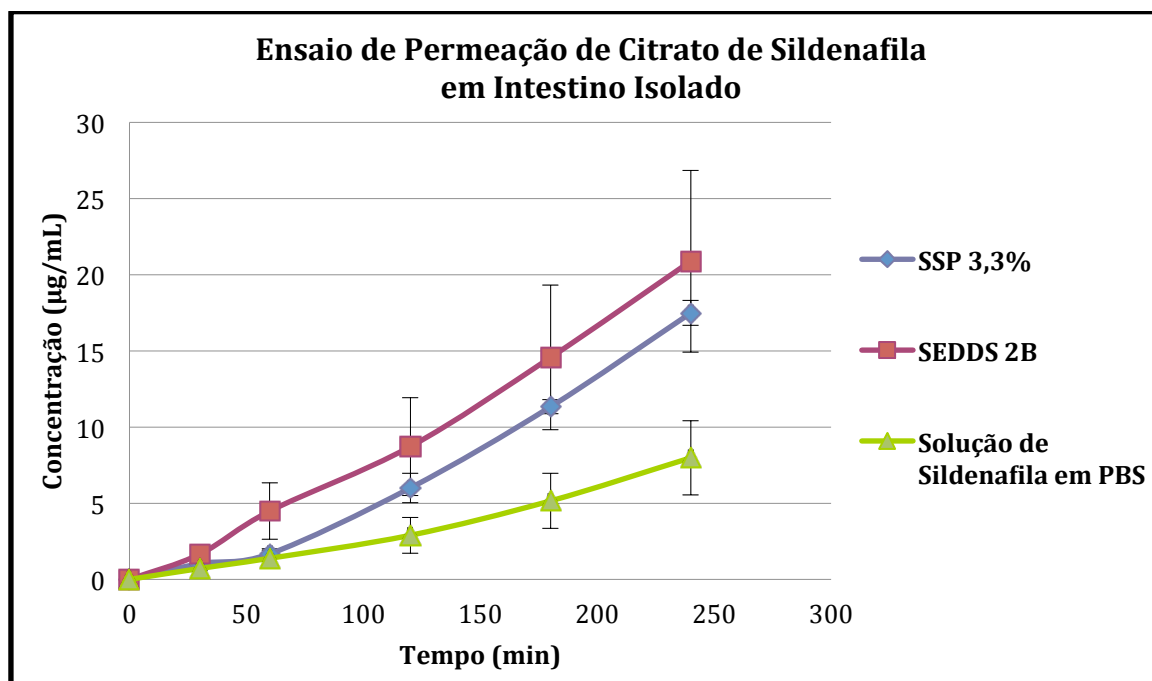


Figura 22. Permeação de citrato de sildenafil nas diferentes formulações em intestino isolado de rato.

Pode-se observar que ao final de 240 minutos, não houve diferença significativa entre as concentrações alcançadas do fármaco quando veiculado sob a forma de solução em 2-pirrolidona (SSP 3,3%) ou no sistema autoemulsionante (SEDDS 2B - 3,3%) ($P > 0,05$). Por outro lado, pode ser evidenciado uma diferença significativa na permeação do fármaco em solução de 2-pirrolidona (SSP 3,3%) quando comparada com o fármaco dissolvido em PBS ($P < 0,05$), apresentando uma permeabilidade aumentada do sildenafil promovida por sua dissolução em 2-pirrolidona. Da mesma forma, pode-se evidenciar um incremento significativo da permeação quando o fármaco está incluído no sistema autoemulsionante (SEDDS 2B - 3,3%) em comparação ao sildenafil em PBS, corroborando dados de literatura sobre a capacidade dos sistemas autoemulsionantes de melhorar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade oral dos fármacos pouco solúveis em água (BAEK *et al.*, 2013).

Os grandes valores de DP observados nos perfis obtidos podem ser justificados pelo uso das membranas biológicas, que estão relacionadas com certa variabilidade nos

resultados do ensaio (CARMO, 2011), uma vez que foram utilizados segmentos diferentes do jejuno em um mesmo experimento.

A promoção da permeação dos sistemas de liberação desenvolvidos pode ser também avaliada pelos valores da área sob a curva obtidos para as três amostras, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Determinação da área sob a curva no ensaio de permeação.

Amostra	Área sob a curva ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)
SSP 3,3%	1671,00
SEDDS 2B	2275,40
SOLUÇÃO DE SILDENAFILA EM PBS	806,06

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

O ensaio de avaliação da toxicidade das formulações é de extrema importância para a consolidação da utilização dos adjuvantes das formulações, em particular a 2-pirrolidona para administração oral em humanos. Embora dados de literatura mostrem uma DL50 oral em ratos de 5000 mg/kg de peso (JAIN; YALKOWSKY, 2007), a qual poderia ser considerada segura para administração em humanos, a 2-pirrolidona só tem sido utilizada em medicina veterinária, inclusive em preparações parenterais (DATE; NAGARSENKER, 2008).

Para a comparação com o placebo da solução SSP, foi selecionado apenas o SEDDS 2 – placebo devido a menor toxicidade do Span[®]80, conforme discutido anteriormente. Foi observada uma mortalidade de apenas 20% no grupo 1 (placebo da solução de 2-pirrolidona) e 0% no grupo 2 (placebo do SEDDS 2), podendo indicar a segurança da utilização destes veículos. Este resultado corrobora os dados de toxicidade disponíveis em literatura para tais adjuvantes e já anteriormente discutidos no presente trabalho.

Mais importante ainda, este estudo sugere a possibilidade da utilização das formulações placebo, uma vez que o volume administrado é correspondente àquele que veicularia a DL50 do fármaco.

Com estes resultados, pode-se considerar estas formas farmacêuticas desenvolvidas viáveis. O SEDDS poderia ser veiculado na forma de cápsulas gelatinosas moles e a solução SSP 3,3% poderia ser utilizada tanto por via oral quanto por via sublingual, o que além do incremento da biodisponibilidade, poderia levar ao ajuste de dose para pacientes que apresentem hipertensão arterial pulmonar ou disfunção erétil.

5 CONCLUSÃO

A solução contendo 3,3% de sildenafil em 2-pirrolidona (SSP 3,3%) se apresentou límpida e incolor sem recristalização do fármaco e foi escolhida para comparação com os sistemas autoemulsionantes de liberação de fármaco (SEDDS) desenvolvidos nesse trabalho.

Foi possível obter dois tipos de SEDDS com diferentes misturas de tensoativos (Tween 80®:Span®20 e Tween®80:Span®80) contendo 1,3% e 3,3% de sildenafil, os quais apresentaram-se transparentes, límpidos, com coloração amarela e teor em torno de 95%.

O estudo de estabilidade mostrou um decaimento do teor de todas as formulações após 90 dias. Os SEDDS 1B e SEDDS 2B foram os que apresentaram maior estabilidade, comparável à estabilidade da solução SSP 3,3%, mesmo sem a presença de um antioxidante, de modo que a inclusão desse adjuvante possivelmente melhoraria a estabilidade dos SEDDS.

O ensaio de avaliação do comportamento dos SEDDS nos meios de liberação de suco gástrico e suco entérico simulados mostrou que os SEDDS foram capazes de formar microemulsões com gotículas de tamanho reduzido, inferiores a 300 nm, após serem expostos ao meio aquoso sob agitação moderada, mimetizando as condições *in vivo*.

A solução SSP 3,3% e o SEDDS 2B, ambos contendo sildenafil a 3,3%, mostraram perfil de permeação do fármaco em intestino isolado superior ao citrato de sildenafil disperso diretamente no meio de permeação (PBS), embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre as formulações desenvolvidas.

O ensaio de toxicidade em camundongos demonstrou a segurança do uso dos veículos das formulações placebo de solução SSP e SEDDS.

A solução SSP 3,3% e o SEDDS 2B podem ser consideradas alternativas viáveis para, futuramente, serem utilizadas tanto por via oral quanto por via sublingual,

aumentando a biodisponibilidade do fármaco e permitindo o ajuste de dose para os pacientes portadores de HAP ou disfunção erétil.

6 PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho são a realização de novos estudos para a inclusão de um antioxidante mais efetivo nas formulações desenvolvidas, a determinação da DL50 dos veículos das formulações (placebos) e das formulações SSP 3,3% e SEDDS 2B e a avaliação da permeação sublingual das preparações.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012. *Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos*. Diário Oficial da União, Brasília, 10 ago. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BADWAN, A.A.; NABUSLI, L.; AL-OMARI, M.M.; DARAGHMEH, N.; ASHOUR, M. *Sildenafil Citrate*. *Britain HG Analytical Profiles of Drug substances and excipients*, Academic Press, 2001, v. 27, p. 339-376.

BAEK, M.K.; LEE, J.H.; CHO, Y.H.; KIM, H.H.; LEE, G.W. *Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of pranlukast hemihydrate: preparation and evaluation*. *International Journal of Nanomedicine*, v. 3(8), p. 167-176, 2013.

BALOIRA, A. *Hipertensión arterial pulmonar: un recorrido por el año 2008*. *Arch Bronconeumol*, v. 45(Supl 1), p. 43-48, 2009.

BAQUERO, H. *Sildenafil en el tratamiento de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido*. *An Pediatr Contin*, v. 7(6), p. 358-360, 2009.

BOOLELL, M.; GEPI-ATTEE, S.; GINGELL, J.C.; ALLEN, M.J. *Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction*. *British Journal of Urology*, v. 78, p. 257-261, 1996.

BROTO, A.R.; TORRES, V.M. *Tratamiento combinado de la hipertensión arterial pulmonar*. *Arch Bronconeumol*, v. 45(1), p. 36-40, 2009.

CARMO, F.A. *Preparo e avaliação de formulações transdérmicas de doxazosina para o tratamento da hiperplasia prostática benigna*. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CENTENO, M.M. *Pulmonary Arterial Hypertension*. *Crit Care Nurs Clin N Am*, v. 23, p. 645-659, 2011.

CHARMAN, S.A.; CHARMAN, W.N.; ROGGE, M.C.; WILSON, T.D.; DUTKO, F.J.; POUTON, C.W. *Self-emulsifying Drug Delivery Systems: Formulation and Biopharmaceutic Evaluation of an Investigational Lipophilic Compound*. *Pharmaceutical Research*, v. 9(1), p. 87-93, 1992.

CHUNG, E.; BROCK, G.B. *Emerging and novel therapeutic approaches in the treatment of male erectile dysfunction*. *Curr Urol Rep*, v. 12, p. 432-443, 2011.

CONSTANTINIDES, P.P. *Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects*. *Pharmaceutical Research*, v. 12(11), p. 1561-1572, 1995.

DARAGHMEH, N.; AL-OLMARI, M.; BADWAN, A.A.; JABER, A.M.Y. *Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 25, p. 483-492, 2001.

DATE, A.A.; NAGARSENKER, M.S. *Parenteral microemulsions: An overview*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 19-30, 2008.

DE PAULA, D. J. *Desenvolvimento de formulação na forma de solução oral de sildenafil para uso na disfunção erétil*. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) — Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás, Goiás, 2011.

EARDLEY, I. *Oral therapy for erectile dysfunction*. *Arch. Esp. Urol.*, v. 63(8), p. 703-714, 2010.

ELNAGGAR, Y.S.R.; EL-MASSIK, M.A.; ABDALLAH, O.Y. *Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 380, p. 133-141, 2009.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Revatio®. Assessment Report, 2012*. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000638/WC500124974.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Revatio®. NDA Approval Letter, 2009*. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2009/022473s000ltr.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Revatio®. NDA Approval Letter, 2012*. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2012/203109Orig1s00ltr.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Revatio*[®]. *Highlights of Prescribing Information, 2012b*. Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021845s008lbl.pdf>.
Acesso em: 26 jun. 2013.

GÀLIE, N. et al.. *Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. *European Heart Journal*, v. 30, p. 2493-2537, 2009.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69(1), p. 1-9, 2008.

GHOFRANI, H.A. et al.. *Oral Sildenafil as long-Term Adjunct Therapy to Inhaled Iloprost in Severe Pulmonary Arterial Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 42(1), p. 158-64, 2003.

GIULIANO, F.; JACKSON, G.; MONTORSI, F.; MARTIN-MORALES, A.; RAILLARD, P. *Safety of sildenafil citrate: review of 67 double-blind placebo-controlled trials and the postmarketing safety database*. *Int J Clin Pract*, v. 64(2), p. 240-255, 2010.

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

HATZIMOURATIDIS, K. *Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction: an overview of the clinical evidence*. *Clinical Interventions in Aging*, v. 1(4), p. 403-414, 2006.

JAIN, P.; YALKOWSKY, S.H. *Solubilization of poorly soluble compounds using 2-pyrrolidone*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 342, p. 1-5, 2007.

JUNG, S.I.; SEO, YG; WOO, JS; YONG, CS; CHOI, HG. *Comparison of the solubility and pharmacokinetics of sildenafil salts*. *Arch Pharm Res*, v. 34(3), p. 451-454, 2011

KANG, B.K.; LEE, J.S.; CHON, S.K.; JEONG, S.Y.; YUK, S.H.; KHANG, G.; LEE, H.B.; CHO, S.H. *Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 65-73, 2004.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. *Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 420, p. 1-10, 2011.

KOHLI, K.; CHOPRA, S.; DHAR, D.; ARORA, S.; KHAR, R.K. *Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability*. Drug Discovery Today, v. 15(21/22), p. 958-965, 2010.

KOMMURU, T.R.; GURLEY, B.; KHAN, M.A.; REDDY, I.K. *Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q₁₀: formulation development and bioavailability assessment*. International Journal of Pharmaceutics, v. 212, p. 233-246, 2001.

LACHENMEIER, D.W.; HAUPT, S.; SCHULZ, K. *Defining maximum levels of higher alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 50, p. 313-321, 2008.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 175-193, 2012.

LEE, M. *Focus on phosphodiesterase inhibitors for the treatment of erectile dysfunction in older men*. Clinical Therapeutics, v. 33(11), p. 1590-1608, 2011.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 46, p. 3-26, 2001.

McLAUGHLIN, V.V. et al. *ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association*. Circulation, v. 119, p. 2250-2294, 2009.

McLAUGHLIN, V.V.; DAVIS, M.; CORNWELL, W. *Pulmonary Arterial Hypertension*. Curr Probl Cardiol, v. 36, p. 461-517, 2011.

MELNIKOV, P.; COBRI, P.P.; CUIN, A.; CAVICCHIOLI, M.; GUIMARÃES, W.R. *Physicochemical properties of sildenafil citrate (Viagra) and sildenafil base*. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 92(10), p. 2140-2143, 2003.

MONTEIRO, L.M. *Preparo e avaliação de sistemas microemulsionados biologicamente ativos de dapsona*. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

NANDI, I.; BARI, M.; JOSHI, H. *Study of Isopropyl Myristate Microemulsion Systems Containing Cyclodextrins to Improve the Solubility of 2 Model Hydrophobic Drugs*. AAPS PharmSciTech, v. 4(1), p. 1-9, 2003.

NEMOTO, S.; SASAKI, T.; OZAWA, H.; KATSUMATA, T.; KISHI, K.; OKUMURA, K.; MORI, Y.; UMEGAKI, O. *Oral sildenafil for persistent pulmonary hypertension early after congenital cardiac surgery in children*. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, v. 38, p. 71-77, 2010.

NICHOLS, D.J.; MUIRHEAD, G.J.; HARNESS, J.A. *Pharmacokinetics of sildenafil citrate after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality*. *Br J Clin Pharmacol*, v. 53, p. 5S-12S, 2002.

NOUDEH, G.D.; KHAZAELI, P.; MIRZAEI, S.; SHARIFIFAR, F.; NASROLLAHOSAIANI, S. *Determination of the toxicity effect of sorbitan esters surfactants group on biological membrane*. *Journal of Biological Sciences*, v. 9(5), p. 423-430, 2009.

O'CALLAGHAN, D.S.; SAVALE, L.; MONTANI, D.; JAÏS, X.; SITBON, O.; SIMONNEAU, G.; HUMBERT, M. *Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies*. *Nature Reviews Cardiology*, v. 8, p. 526-538, 2011.

PFIZER PHARMACEUTICALS GROUP. *Revatio®. Material Safety Data Sheet, 2008*.

Disponível em:

<http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/PZ00976.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2013.

POUTON, C.W. *Formulation of self-emulsifying drug delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 25, p. 47-58, 1997.

POUTON, C.W. *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11(Suppl 2), p. S93-S98, 2000.

POUTON, C.W.; PORTER, C.J.H. *Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 625-637, 2008.

RAJA, S.G.; NAYAK, S.H. *Sildenafil: Emerging Cardiovascular Indications*. *Ann Thorac Surg*, v. 78, p. 1496-1506, 2004.

RAJA, S.G.; DANTON, M.D.; MacARTHUR, K.J.; POLLOCK, J.C. *Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension with Sildenafil: From Pathophysiology to Clinical Evidence*. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, v. 20(5), p. 772-735, 2006.

RAMANI, G.V.; PARK, M.H. *Update on the clinical utility of sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension*. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 61-70, 2010.

RAPOSO-SONNENFELD, I.; OTERO-GONZÁLEZ, I.; BLANCO-APARICIO, M.; FERRER-BARBA, A.; MEDRANO-LÓPEZ, C. *Tratamiento con sildenafil y/o bosentán en niños y jóvenes con hipertensión arterial pulmonary idiopática y síndrome de Eisenmenger*. *Rev Esp Cardiol*, v. 60(4), p. 366-372, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova*, v. 27(5), p. 771-780, 2004.

SCHERMULY, R.T.; GHOFRANI, H.A.; WILKINS, M.R.; GRIMMINGER, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, v. 8, p. 443-455, 2011.

SHABIR, G.A. *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization*. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, N.H.; CARVAJAL, M.T.; PATEL, C.I.; INFELD, M.H.; MALICK, A.W. *Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 106, p. 15-23, 1994.

SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. *Erectile dysfunction*. *The Lancet*, v. 381, 153-165, 2013.

SIMÕES, S.I.; TAPADAS, J.M.; MARQUES, C.M.; CRUZ, M.E.M.; MARTINS, M.B.F.; CEVC, G. *Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80*. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 26, p. 307-317, 2005.

SIMONNEAU, M.D. et al. *Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54(1), Suppl S, p. S43-S54, 2009.

SOUZA, A.H.A.; CABRAL, L.M.; HUF, G. *Current practices in the use of sildenafil for pulmonary arterial hypertension in Brazilian hospitals*. *BMC Research Notes*, v. 2(30), p. 1-5, 2009.

SUBRAMANIAN, N.; RAY, S.; GHOSAL, S.K.; BHADRA, R.; MOULIK, S.P. *Formulation Design of Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems for Improved Oral Bioavailability of Celecoxib*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 27(12), p. 1993-1999, 2004.

TAKIZAWA, Y.; KISHIMOTO, H.; NAGAWAKA, M.; SAKAMOTO, N.; TOBE, Y.; FURUYA, T.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. *Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, p. 363-370, 2013.

TSERTSVADZE, A. *et al.* *Oral Sildenafil Citrate (Viagra) for Erectile Dysfunction: A Systematic Review and Meta-analysis of Harms*. *Urology*, v. 74(4), p. 831-836, 2009.

TUDER, R.M.; ABMAN, S.H.; BRAUN, T.; CAPRON, F.; STEVENS, T.; THISTLETHWAITE, P.A.; HAWORTH, S.G. *Development and pathology of pulmonary hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54(1), Suppl S, p. S3-S9, 2009.

WEI, W.; WANG, Y.; QUE, L. *Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, p. 288-294, 2006.

WILLIAMS, S.K.; MELMAN, A. *Novel therapeutic targets for erectile dysfunction*. *Maturitas*, v. 71, p. 20-27, 2012.

WOO, J.S.; SONG, Y.K.; HONG, J.Y.; LIM, S.J.; KIM, C.K. *Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 159-165, 2008.

ZHANG, P.; LIU, Y.; FENG, N.; XU, J. *Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 269-276, 2008.