

1 Universidade Federal do Rio de Janeiro

2 Faculdade de Farmácia

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

4

5

6

7 **FORMULAÇÃO LÍQUIDA ORAL DO ACETATO DE**

8 **HIDROCORTISONA INCLUSO EM CICLODEXTRINA:**

9 **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA**

10 **ANALÍTICA**

11

12

13

14

15

16

17 Márcio Robert Mattos da Silva

18

19

20

Rio de Janeiro

21

22

Agosto 2005

23

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**FORMULAÇÃO LÍQUIDA ORAL DO ACETATO DE
HIDROCORTISONA INCLUSO EM CICLODEXTRINA:
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA
ANALÍTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Márcio Robert Mattos da Silva

Orientadora: Profa. Dr^a. Sheila Garcia
Co-orientador(a): Profa. Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos

Rio

2005

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90

Ficha Catalográfica

S586f

Silva, Márcio Robert Mattos.

Formulação líquida oral do acetato de hidrocortisona incluso em ciclodextrina: desenvolvimento e validação da metodologia analítica/ Márcio Robert Mattos da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/ Faculdade de Farmácia, 2005.

xviii, 126 f.: 35 cm.

Orientador: Sheila Garcia

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Farmácia/ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

Referências Bibliográficas: f. 119-126.

1. Ciclodextrinas. 2. Química farmacêutica. 3. CLAE. 4. Acetato de hidrocortisona. 5. Validação. 6. Controle de qualidade. 7. Microscopia eletrônica de varredura. 8. RMN de H¹. 9. IV. 10. Modelagem molecular. 11. DSC. I. Garcia, Sheila. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 615.19

91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115

A Deus, criador de todas as coisas
e ao meu pai Armando *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

1 Agradeço à minha família, mãe (Sônia), irmãos, esposa (Renata), pela
2 atenção, paciência e estímulo, durante a minha vida.

3 Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora professora Sheila,
4 pelo empenho e paciência em me ajudar durante toda a fase desse trabalho.

5 À indústria Oficifarma Produtos Farmacêuticos, proprietário e colegas de
6 trabalho.

7 Às professoras Elisabete Pereira dos Santos e Rita de Cássia Assunção, pelo
8 suporte técnico com o desenvolvimento dos complexos de inclusão, formulações e
9 envio das amostras.

10 À professora Magaly Girão do IQ., pela sua ajuda com a modelagem
11 molecular.

12 Ao professor Flávio Mores, da Universidade Estadual de Maringá, pela sua
13 grande ajuda nos cálculos envolvendo o complexo de inclusão.

14 À Márcia Sader do Laboratório de microscopia eletrônica, COPPE-UFRJ,
15 pelas análises realizadas no MEV.

16 Ao Francisco de Assis “Chicão” e Cosme do NPPN, pela liofilização e análise
17 de RMN de H¹ das amostras, muito obrigado.

18 À empresa Cargill pela doação das ciclodextrinas.

19 À professora Adriane da Biofísica, pela ajuda com os resultados de RMN H¹.

20 Aos colegas de turma do mestrado e funcionários do LabCQ (Marcio Miranda,
21 Ana F., Edilene, Vívian, Eliane, Bianca, Laís, Mariana e Vinícius, pela rica troca de
22 conhecimentos, todos vocês têm uma pequena parcela nesse trabalho.

23

RESUMO

1 **Silva, Márcio Robert Mattos.** Formulação líquida oral do acetato de hidrocortisona
2 em ciclodextrina: **desenvolvimento e validação da metodologia analítica.** Rio de
3 **Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade**
4 **de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.**

5
6
7
8
9 As ciclodextrinas têm sido utilizadas em formulações orais para aumentar a
10 solubilidade e a estabilidade das substâncias em água.

11 A hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma doença autossômica recessiva
12 causada pela deficiência na síntese do cortisol, ausência da 21-alfa-hidroxilase, uma
13 enzima que participa do processo de biossíntese do esteróide (cortisol) da supra-
14 renal. A terapia mais apropriada para a HAC é a hidrocortisona, em doses de 10 a
15 15 mg/m²/24h. O acetato de hidrocortisona (AH) é um corticóide do grupo dos
16 glicocorticóides. É insolúvel em água, o que dificulta a sua utilização em forma de
17 solução.

18 O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma formulação líquida oral do AH
19 incluso em ciclodextrina, para auxiliar no tratamento da hiperplasia adrenal
20 congênita, facilitando a administração desse medicamento em crianças. Desta forma
21 avaliou-se a inclusão do AH em gama ciclodextrina e hidroxipropil β-ciclodextrina
22 (HPβCD).

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

RESUMO

34 Os complexos de inclusão do AH em ciclodextrinas foram preparados pelo
35 método de diagrama de solubilidade de fases, segundo Higuchi & Connors, 1965.

36 Foi definida a condição ideal na preparação do complexo de inclusão, sendo o
37 acetato de hidrocortisona (AH) com hidroxipropil β -cyclodextrina e água, sob
38 agitação a 37°C, por 1 hora, uma técnica simples e rápida.

39 O complexo que apresentou melhor percentual de inclusão foi o AH/HP β CD
40 na proporção de 5 mM para 134 mM, respectivamente, obtendo-se 91,5%. Foram
41 empregadas as seguintes técnicas para a caracterização do complexo de inclusão
42 AH/HP β CD: IV, DSC, MEV, RMN de H^1 e DRX.

43 As técnicas de IV, RMN de H^1 e MEV permitiram caracterizar a formação do
44 complexo de inclusão AH/HP β CD.

45 A estequiometria obtida para o complexo foi de 1:1 e a constante de
46 estabilidade calculada foi de 2320 M^{-1} , demonstrando uma adequada associação.

47 Foi possível promover a solubilização em água do AH pela inclusão em
48 HP β CD.

49 O modelo proposto de modelagem molecular está de acordo com os dados
50 experimentais, que indicam uma relação estequiométrica de 1:1.

51 Foram desenvolvidas três formulações líquidas orais, onde buscou-se um
52 melhor conservante, e para a sua análise foi desenvolvido e validado um método
53 analítico por CLAE, que quantifica-se o AH nestas formulações, em presença do
54 conservante e de possíveis produtos de degradação.

55
56
57
58

ABSTRACT

1 **Silva, Márcio Robert Mattos.** Formulação líquida oral do acetato de hidrocortisona
2 em ciclodextrina: **desenvolvimento e validação da metodologia analítica.** Rio de
3 **Janeiro, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade**
4 **de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.**

5
6
7
8
9 The cyclodextrins have been used in oral formulations to increase the
10 solubility and the stability of substances in water.

11 The congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a recessive autosomic disease
12 caused by the deficiency in the cortisol synthesis, absence of the 21-alpha-
13 hydroxylase, an enzyme that participates in the steroid (cortisol) biosynthesis process
14 of the suprarenal. The most suitable therapy for the CAH is the hydrocortisone in
15 doses from 10 to 15 mg/m²/24 hours. The hydrocortisone acetate (HA) is a corticoid
16 belonging to the glycocorticoids group. It is insoluble in water what makes it difficult to
17 be used in a solution state.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

ABSTRACT

37 The aim of this paper was to develop a oral liquid formulation of the HA
38 inclusion in cyclodextrin to assist in the treatment of congenital adrenal hyperplasia
39 facilitating the administration of such medicine on children. Thus the inclusion of HA
40 in gama cyclodextrin and hydroxypropyl β -cyclodextrin (HP β CD) was evaluated.

41 The HA inclusion complexes in cyclodextrins were prepared by the phase
42 solubility diagram according to Higuchi & Connors, 1965.

43 The ideal condition for the preparation of the inclusion complex was defined
44 and the hydrocortisone acetate (HA) with hydroxypropyl β -cyclodextrin and water
45 under shaking at 37°C for 1 hour, a simple and quick technique.

46 The complex that presented the best inclusion rate was the HA/HP β CD in a
47 proportion of 5 mM to 134 mM, respectively, obtaining 91,5%. The following
48 techniques were used to reach the characterization of the inclusion complex
49 HA/HP β CD: IR, DSC, SEM, HMR of H¹ and XRD.

50 The IR, NMR of H¹ and SEM techniques allowed the characterization to form
51 the HA/HP β CD inclusion complex.

52 The stoichiometry obtained for the complex was 1:1 and the stability constant
53 estimated was 2320 M⁻¹, what demonstrates a suitable association.

54 It was possible to promote the solubilization of HA in water through its
55 inclusion in HP β CD.

56 The molecular modelling model is in accordance with the experimental data
57 that indicate a stoichiometric relation at 1:1.

58

59

60

ABSTRACT

61 Three oral liquid formulations were developed and a better preservative was
62 used and for its analysis an analytical method by HPLC was developed and
63 evaluated where the HA is quantified in such formulations in the presence of
64 preservative and possible degradation products.

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

1

α : alfa

Δ : aquecimento

β : beta

λ : comprimento de onda

$^{\circ}$ C: graus Celsius

a: inclinação da reta

Aa: absorvância da amostra

ACTH: hormônio adreno corticotrópico

AH: acetato de hidrocortisona

AL: aumento de solubilidade com desvio positivo

An: aumento de solubilidade com desvio negativo

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b: intercepto

Bi: redução de solubilidade com complexo insolúvel

Bs: redução de solubilidade com complexo pouco solúvel

C: concentração

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMD: concentração média determinada

CRF: fator de liberação da corticotropina

CV: coeficiente de variação

CV: coeficiente de variação

DMSO: dimetil sulfóxido

DPR: desvio padrão relativo

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

DRX: difração de raios-X

DSC: calorimetria diferencial de varredura

g: grama

G: grupo

h: hora

HAC: hiperplasia adrenal congênita

HP β CD: hidroxipropil beta-ciclodextrina

ICH: International Conference on Harmonization ou Conferência Internacional de Harmonização

IV: infravermelho

Ks: constante de estabilidade

M: molar

MEV: microscopia eletrônica de varredura

min: minuto

mL/min: mililitro por minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MS: Ministério da Saúde

n: número de replicatas

NF: National Formulary

nm: nanômetro

P.A.: pró análise

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

PBS: tampão fosfato salino

pH: potencial de hidrogênio inico

qsp: quantidade suficiente para

r: coeficiente de correlao

RE: resoluo

RMN de H¹: ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

USP: United States Pharmacopeia

UV/Vis: radiaoes ultravioleta e visível

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

LISTA DE TABELAS

1

Figura 1	Representação esquemática da síntese do cortisol	04
Figura 2	Estrutura do acetato de hidrocortisona	13
Figura 3	Forma e dimensões moleculares das ciclodextrinas naturais	17
Figura 4	Estruturas de ciclodextrinas naturais	18
Figura 5	Estrutura da HP β CD	19
Figura 6	Representação esquemática da formação do complexo de inclusão	24
Figura 7	Diagrama de solubilidade de fases	27
Figura 8	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos I e II	50
Figura 9	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos III e IV	51
Figura 10	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos V e VI	52
Figura 11	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos VII, VIII e IX	53
Figura 12	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para o grupo X	54
Figura 13	Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para o grupo XI	55
Figura 14	Preparação do complexo de inclusão do AH em HP β CD, veículo água	57

LISTA DE TABELAS

Figura 15	Preparação do complexo de inclusão do AH em HP β CD, veículo PBS 0.1M pH 7.4	59
Figura 16	Preparação da solução amostra para análise de precisão do método	73
Figura 17	Espectro de IV do padrão de acetato de hidrocortisona	79
Figura 18	Espectro de IV do acetato de hidrocortisona matéria-prima	79
Figura 19	Espectro de UV do acetato de hidrocortisona matéria-prima	80
Figura 20	Espectro de IV do AH padrão sigma	88
Figura 21	Espectro de IV do pó retido pela filtração durante a preparação do complexo de inclusão do AH em ciclodextrinas	88
Figura 22	Espectros de UV do complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado	90
Figura 23	Diagrama de solubilidade de fase do complexo de inclusão do AH em HP β CD	91
Figura 24	Espectros de IV: A) AH matéria-prima, B) HP β CD matéria-prima, C) mistura física, D) complexo de inclusão do AH em HP β CD liofilizado	94
Figura 25	Termogramas: 1) AH deg, 2) AH galena, 3) HP β CD matéria-prima, 4) mistura física e 5) complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado	95
Figura 26	Espectros de RMN de H1, em A) HP β CD e B) complexo de Inclusão	97

LISTA DE TABELAS

Figura 27	Fotomicrografias feitas em MEV, aumento de 300 vezes. Em A) AH matéria-prima 300x, B) HP β CD matéria-prima 300x C) mistura física 300x, D) complexo de inclusão do AH em HP β CD liofilizado 300x	99
Figura 28	Fotomicrografias feitas em MEV, aumento de 5000 vezes. Em A) AH matéria-prima 5000x, B) HP β CD matéria-prima 5000x C) mistura física, D) complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado 5000x	101
Figura 29	Fotomicrografia feita em MEV, aumento de 2000 vezes, do complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado 2000x	102
Figura 30	Cromatograma do padrão de AH	104
Figura 31	Cromatograma do AH matéria-prima sob estresse-condição 5	105
Figura 32	Cromatograma da preparação – condição 8	105
Figura 33	Curva de calibração do AH por CLAE	106
Figura 34	Cromatograma da base da 1 ^a e 2 ^a formulações	108
Figura 35	Cromatograma da base da 3 ^a formulação	109
Figura 36	Cromatograma da 1 ^a formulação	110
Figura 37	Cromatograma da 2 ^a formulação	110
Figura 38	Cromatograma da 3 ^a formulação	111
Figura 39	Modelagem molecular, visão frontal e lateral do complexo de inclusão do AH em HP β CD	112
Figura 40	Modelagem molecular 3D, visão frontal e lateral do complexo de inclusão do AH em HP β CD	114

LISTA DE TABELAS

Figura 41	Difração de raios-X das amostras: 1) AH matéria-prima; 2) HP β CD matéria-prima; 3) mistura física; 4) complexo de inclusão do AH em HP β CD	115
-----------	--	-----

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

LISTA DE TABELAS

1

Tabela 1	Comparação dos parâmetros analíticos para produto e matéria-prima	14
Tabela 2	Metodologia analítica para β -ciclodextrina	15
Tabela 3	Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas e derivados	19
Tabela 4	Comparação dos parâmetros de validação do método analítico quantitativo, categoria – 1	36
Tabela 5	Fatores a serem considerados na determinação da robustez	39
Tabela 6	Proporções dos componentes das amostras para obtenção de pastilhas de brometo de potássio	63
Tabela 7	Solubilidade do complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado	66
Tabela 8	Solubilidade da mistura física AH/HP β CD	66
Tabela 9	Preparação do xarope simples, utilizando diferentes concentrações de conservantes	68
Tabela 10	Preparação da formulação do AH/HP β CD no xarope simples com metilparabeno	68
Tabela 11	Preparação da formulação do AH/HP β CD no xarope simples com sorbato de potássio	68
Tabela 12	Condições cromatográficas testadas para a matéria-prima AH sob estresse	71
Tabela 13	Condições cromatográficas testadas para o complexo de inclusão do AH/HP β CD na formulação	71
Tabela 14	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo I	81
Tabela 15	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo II	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 16	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo III	82
Tabela 17	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo IV	82
Tabela 18	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo V	82
Tabela 19	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo VI	83
Tabela 20	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo VII	83
Tabela 21	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo VIII	83
Tabela 22	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo IX	84
Tabela 23	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo X	84
Tabela 24	Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo XI	85
Tabela 25	Percentual de inclusão do AH em HP β CD – veículo água	86
Tabela 26	Percentual de inclusão do AH em HP β CD – veículo PBS 0.1M pH 7.4	86
Tabela 27	Resultados do teste de solubilidade do complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado	103
Tabela 28	Resultados do teste de solubilidade do complexo de inclusão mistura física	103
Tabela 29	Parâmetros de precisão do método analítico	107
Tabela 30	Parâmetros de exatidão do método analítico	107
Tabela 31	Teor das formulações do AH incluso em HP β CD	111

SUMÁRIO

1
2
3
4
5
6
7
8

RESUMO

ABSTRACT

I-	INTRODUÇÃO	01
II-	REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1-	Hiperplasia Adrenal Congênita	04
2.2-	Corticóides	06
2.2.1-	Propriedades Farmacodinâmicas dos Glicocorticóides	07
2.2.1.1-	Mecanismo de ação	07
2.2.1.2-	Efeitos fisiológicos	07
2.2.1.3-	Efeitos metabólicos	08
2.2.1.4-	Efeitos catabólicos	08
2.2.1.5-	Efeitos antiinflamatórios e imunossupressor	09
2.2.3-	Propriedades Farmacocinéticas	09
2.2.4-	Uso terapêutico	10
2.2.4.1-	Doenças Endócrinas	10

SUMÁRIO

2.2.4.2- Terapia de hidrocortisona em doenças não endócrinas	10
2.2.5- Toxicidade	11
2.3- Acetato de Hidrocortisona	12
2.3.1- Características: Físico-químicas	12
2.3.2- Relação Estrutura versus Atividade	13
2.4 Metodologias Analíticas	14
2.5- Ciclodextrina	16
2.5.1- Adjuvante de solubilização	16
2.5.2- Requisitos para a Formação dos Complexos	22
2.5.3- Mecanismo de complexação	24
2.5.4- Preparação dos complexos	25
2.5.5- Caracterização dos Complexos de Inclusão	26
2.6 Formas Farmacêuticas Líquidas	29
2.6.1- Solução	29
2.6.1.1- Xaropes	30
2.6.1.1.1- Preparação dos xaropes	30
2.6.1.1.2- Fatores que afetam a solubilidade de uma substância e interferem na formulação	32
2.7- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
2.8- Validação da Metodologia Analítica Quantitativa	36
2.8.1- Linearidade	37

SUMÁRIO

2.8.2- Precisão	37
2.8.3- Exatidão	38
2.8.4- Especificidade	38
2.8.5- Intervalo	39
2.8.6- Robustez	39
III- OBJETIVOS	40
3.1- Objetivos Gerais	40
3.2- Objetivos Específicos	40
IV- Materiais e Métodos	42
4.1- Planejamento	42
4.1.1- Departamento de Medicamentos	42
4.2- Materiais	44
4.2.1- Reagentes	44
4.2.2- Equipamentos	45
4.2.3- Vidrarias e outros	46
4.3- Métodos	47
4.3.1- Análise da Matéria-prima	47
4.3.1.1- Acetato de Hidrocortisona	47

SUMÁRIO

4.3.2- Preparação dos Complexos de Inclusão do Acetato de Hidrocortisona em Ciclodextrinas	48
4.3.2.1- Preparação do complexo de inclusão do acetato de Hidrocortisona em gama ciclodextrina	48
4.3.2.2- Preparação do complexo de inclusão do acetato de hidrocortisona em hidroxipropil β-ciclodextrina utilizando água como veículo	56
4.3.2.3- Preparação do complexo de inclusão do acetato de Hidrocortisona em Hidroxipropil β-ciclodextrina, utilizando como veículo Tampão Fosfato Salino (PBS) 0,1M pH 7,4	58
4.3.2- Identificação do pó retido pela filtração durante preparações do complexo de inclusão do AH em ciclodextrinas (gama ciclodextrina e hidroxipropil)	60
4.3.4- Preparação e liofilização do complexo de Inclusão do acetato de Hidrocortisona em hidroxipropil β-ciclodextrina	60
4.3.5- Caracterização do complexo de inclusão da Hidrocortisona em hidroxipropil β-ciclodextrina	61
4.3.5.1- Determinação da estequiometria	61
4.3.5.2- Determinação da constante de estabilidade (Ks)	62
4.3.5.3- Caracterização do complexo de inclusão AH/HPβCD liofilizado por Infravermelho (FTRI)	63

SUMÁRIO

9

4.3.5.3-	Caracterização do complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	64
4.3.5.4-	Caracterização do complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado por ressonância magnética nuclear (RMN de H ¹)	64
4.3.5.5-	Caracterização do complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
4.3.6-	Teste de solubilidade em água do complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado e da mistura física	65
4.3.7-	Doseamento do AH no complexo de inclusão	66
4.3.8-	Desenvolvimento da Formulação Líquida de Acetato de Hidrocortisona incluso em hidroxipropil β -ciclodextrina	67
4.3.8.1-	Preparação da formulação	67
4.3.9-	Desenvolvimento das Condições Cromatográficas para análise das formulações com AH/HP β CD	70
4.3.10-	Validação da Metodologia Analítica para a Formulação de AH	72
4.3.10.1-	Linearidade	72
4.3.10.2-	Precisão	73
4.3.10.3-	Exatidão	74
4.3.10.4-	Interferência dos excipientes	74

SUMÁRIO

4.3.11-	Análise Quantitativa do Acetato de Hidrocortisona nas Formulações Desenvolvidas	75
4.3.12-	Estudo de Modelagem Molecular do complexo de inclusão AH/HP β CD	76
4.3.13-	Análise de difração de raios-X do complexo de inclusão AH/HP β CD	77
V-	Resultados e Discussão	78
5.1-	Acetato de Hidrocortisona	78
5.1.1-	Aspecto, cor e odor	78
5.1.2-	Identificação	78
5.1.3-	Solubilidade	79
5.1.4-	Perda por secagem	79
5.1.5-	Ponto de fusão	80
5.1.6-	Teor	80
5.2-	Avaliação dos complexos de inclusão do Acetato Hidrocortisona em ciclodextrinas	81
5.2.1-	Avaliação do complexo de inclusão do Acetato de Hidrocortisona em gama ciclodextrina	81
5.2.2-	Avaliação dos complexos de inclusão do Acetato de Hidrocortisona em hidroxipropil β -ciclodextrina	86

SUMÁRIO

5.3-	Avaliação da identificação do pó retido pela filtração durante as preparações do complexo de inclusão do Acetato de Hidrocortisona em ciclodextrinas (gama ciclodextrina e hidroxipropil β-ciclodextrina)	88
5.4-	Obtenção e Isolamento do complexo de inclusão do Acetato de Hidrocortisona em hidroxipropil β-ciclodextrina	89
	5.4.1- Teor do complexo de inclusão do AH em HPβCD	90
5.5-	Caracterização do Complexo de Inclusão do AH em HPβCD	91
	5.5.1- Determinação da estequiometria	91
	5.5.2- Determinação da constante de estabilidade (Ks)	92
	5.5.3- Caracterização do complexo de inclusão AH em HPβCD liofilizado por IV com transformada de Fourier (FTRI)	94
	5.5.4- Caracterização do complexo de inclusão AH em HPβCD liofilizado por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	95
	5.5.5- Caracterização do complexo de inclusão AH/HPβCD liofilizado por ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN-H¹)	97
	5.5.6- Caracterização do complexo de inclusão AH/HPβCD liofilizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	99
	5.5.7- Solubilidade em água do complexo de inclusão AH/HPβCD liofilizado e da mistura física	103

SUMÁRIO

5.6-	Desenvolvimento das condições cromatográficas da formulação líquida de acetato de hidrocortisona	104
5.7-	Validação da metodologia analítica para a formulação	106
	5.7.1- Linearidade	106
	5.7.2- Precisão	106
	5.7.3- Exatidão	107
	5.7.4- Especificidade	108
5.8-	Análise quantitativa do AH nas formulações desenvolvidas	110
5.9-	Estudos de Modelagem Molecular do complexo de inclusão do AH/HPβCD	112
5.10-	Avaliação da Difração de raios-X das amostras	115
VI-	Conclusões	116
VII-	Perspectivas futuras	118
VIII-	Referências Bibliográficas	119

10
11
12
13
14
15
16
17

1 I- INTRODUÇÃO

2

3 A hidrocortisona é um corticóide do grupo dos glicocorticóides naturais, que
4 são hormônios esteroidais sintetizados e liberados pelo córtex da supra-renal a partir
5 do colesterol. Vários trabalhos demonstraram que é a melhor terapia de reposição
6 em pacientes com hiperplasia adrenal congênita (FILHO *et al.*, 2001), sendo esta
7 patologia causada pela deficiência na biossíntese do cortisol (VILAR, CASTELLAR &
8 MOLHA, 2000). É um grupo de doenças de herança autossômica recessiva que
9 afeta a estereoidogênese supra-renal (FILHO, *et al.*, 2001) e nos dias atuais, a terapia
10 mais utilizada para o tratamento embora não seja a mais adequada é a prednisona
11 (atividade glicocorticóide e mineralocorticóide). Tal fato deve-se a inexistência de uma
12 formulação líquida oral de acetato de hidrocortisona estável no mercado
13 farmacêutico.

14 A insolubilidade em água do acetato de hidrocortisona (AH) torna difícil sua
15 utilização em solução aquosa; dessa forma, suspensões orais infantis têm sido
16 utilizadas para auxiliar no tratatamento de crianças com hiperplasia adrenal
17 congênita tratadas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e atendidas pela
18 Farmácia Universitária.

19 O fato de serem administradas na forma de solução aumenta a velocidade de
20 absorção no trato gastro intestinal e conseqüentemente a chegada na circulação
21 sistêmica quando comparada à forma farmacêutica suspensão oral (ANSEL,
22 POPOVICH & ALLEN, 2000).

1 Possibilidades de formação de complexos de inclusão da substância ativa
2 com ciclodextrina são citadas na literatura com o objetivo de aumentar a solubilidade
3 de fármacos insolúveis em água (KRISTMUNDSTÓTTIR, *et al.*, 1996).

4 Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-
5 glicose unidas através de ligações glicosídicas alfa (1,4), obtidas através da
6 degradação enzimática do amido. As ciclodextrinas mais conhecidas são: alfa, beta
7 e gama constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam
8 a conformação de cadeira (BRITTO, JÚNIOR & SANTOS, 2004).

9 Essas moléculas são conhecidas pela habilidade de formar complexos de
10 inclusão com vários fármacos lipofílicos, modificando as suas propriedades físico-
11 químicas. A complexação molecular pode ocorrer no estado sólido ou em solução, e
12 as características físico-químicas da molécula hóspede podem ser mudadas
13 (BEKERS *et al.*, 1991). O que irá determinar o quanto a substância ativa está
14 protegida, no caso, passa a ser a constante de associação ou de estabilidade K_s .
15 Essa constante de equilíbrio indica se a molécula está associada (protegida no
16 interior da cavidade da ciclodextrina) ou dissociada (livre em solução), de acordo
17 com seu valor numérico, isto é, seu valor é diretamente proporcional a associação
18 da molécula hóspede no interior da ciclodextrina (HARRIS, 1995; LOFTSSON &
19 BREWSTER, 1996).

20 As ciclodextrinas são utilizadas em formulação oral e tópica para melhorar a
21 estabilidade física, química, biodisponibilidade e reduzir a incidência de efeitos
22 adversos (DUCHÊNE, VAUTION & GLOMOT, 1986; SZEJTLI, 1990 apud SHEN *et*
23 *al.*, 2005). Além disso, não são tóxicas (DUCHÊNE *et al.*, 1984 apud MATIOLI,
24 MORES & ZANIN, 2000).

1 Ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com as
2 substâncias ativas de baixa solubilidade, que então serão solúveis em água, como
3 os esteróides, pela complexação por parte da molécula na cavidade hidrofóbica da
4 ciclodextrina (SZEJTLI, 1988).

5 Este trabalho de pesquisa destina-se a desenvolver complexos de inclusão do
6 acetato de hidrocortisona (AH) em ciclodextrinas, obtendo o melhor percentual de
7 inclusão, estequiometria e a constante de estabilidade (K_s) do complexo. O
8 desenvolvimento de uma formulação líquida oral de acetato de hidrocortisona, e a
9 validação da metodologia analítica quantitativa, separando os possíveis produtos de
10 degradação da substância ativa, também foram objetivos deste trabalho.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

II- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA

O termo hiperplasia adrenal congênita (HAC) refere-se a síndrome causada pela deficiência na biossíntese do cortisol. O fator liberador da corticotropina (CRF) do hipotálamo estimula a hipófise que libera o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), este irá estimular as supra-renais a sintetizar o cortisol, a partir do colesterol, sob ação de várias enzimas (WILSON *et al.*, 1999).

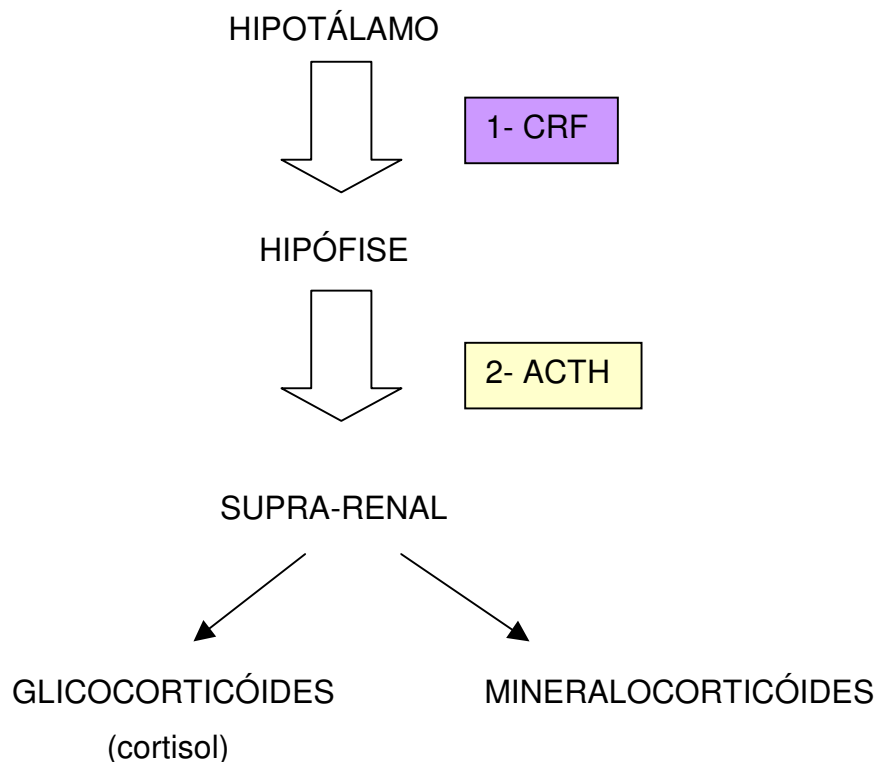


Figura 1: Representação esquemática da síntese do cortisol. Em 1) fator liberador da corticotropina, 2) hormônio adrenocorticotrópico. Nota: dados trabalhados pelo autor.

1 Em 90% dos casos ocorre a doença quando há uma deficiência da enzima
2 21-alfa-hidroxilase, não sintetizando o cortisol (VILAR *et al.*, 2000).

3 A deficiência enzimática (21-alfa-hidroxilase) é causada pela mutação do
4 gene CYP 21 que codifica a síntese dessa enzima, como resultado dessa mutação
5 deixa de ocorrer a produção de cortisol (WILSON *et al.*, 1999).

6 Os sintomas da doença são causados pela ausência da síntese do cortisol,
7 deficiência de aldosterona, já que essa enzima 21-alfa-hidroxilase é responsável
8 pela síntese da aldosterona e acúmulo de androgênios: levando ao
9 pseudohermafroditismo, hiponatremia, hipercalcemia e hipoaldosterismo, o
10 aumento de androgênio leva à puberdade precoce (WILSON *et al.*, 1999).

11 O tratamento baseia-se na reposição de glicocorticóide, sendo o mais
12 recomendado a hidrocortisona na dose de 18 mg/m²/24h (WILSON *et al.*, 1999).

13 A partir da constatação de que a secreção fisiológica de cortisol é menor que
14 os valores considerados normais, doses substitutivas menores que a recomendada
15 de hidrocortisona foram gradativamente aceitas, sendo aproximadamente 10 a 15
16 mg/m²/24h a reconhecida como apropriada (SILVA *et al.*, 2005).

17 A média mundial da doença é de 1 em cada 10.000 recém-nascidos (VILAR
18 *et al.*, 2000).

19

20

21

22

23

24

25

1 2.2- CORTICÓIDES

2

3 São hormônios esteroidais que são sintetizados e liberados pelo córtex da
4 supra-renal a partir do colesterol. O controle dessa liberação é determinado pelo
5 hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na hipófise, que estimula as células da zona
6 reticular e fasciculada do córtex da supra-renal.

7 A secreção de ACTH pela hipófise é determinada pelo equilíbrio entre os
8 efeitos neurais do sistema nervoso hipotalâmico e os efeitos inibidores dos
9 corticóides: retro-alimentação negativa.

10 Os corticóides são divididos em três grupos:

11 - Glicocorticóides :

12 O mais importante é o cortisol ou hidrocortisona, têm papel importante no
13 metabolismo de carboidratos.

14 - Mineralocorticóides:

15 O mais importante é a aldosterona, regulam a homeostasia de eletrólitos

16 -Androgênios e estrogênios.

17 (DALE, RANG & RITTER, 1997)

18

19

20

21

22

23

24

2.2.1- PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS DOS GLICOCORTICÓIDES

2.2.1.1- MECANISMO DE AÇÃO

Após penetrarem no tecido, os glicocorticóides difundem-se pela membrana celular ligando-se a seus receptores no citoplasma. O complexo hormônio–receptor é transportado até o núcleo onde se liga a elementos de respostas aos glicocorticóides, no DNA. Na ausência do hormônio a ligação é inibida (GOODMAN & GILMAN'S, 1990).

2.2.1.2- EFEITOS FISIOLÓGICOS

Reduz a utilização da glicose e aumenta a sua produção pela gliconeogênese;

- Aumenta o armazenamento de glicogênio no músculo, porque aumenta a insulina;
- Aumenta o catabolismo das proteínas;
- Aumenta a ação dos hormônios lipolíticos;
- Redução da inflamação crônica e reações auto-imunes;
- Retro-alimentação negativa sobre o hipotálamo e hipófise, com diminuição do ACTH;
- Diminuição do equilíbrio hidroeletrolítico, diminuição de cálcio, potássio e sódio (DALE; RANG & RITTER, 1997).

2.2.1.3- EFEITOS METABÓLICOS

Os efeitos ocorrem sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Essas ações são responsáveis por alguns dos efeitos colaterais graves associados ao uso em doses terapêuticas.

Os glicocorticóides aumentam a captação de aminoácidos pelo fígado e rins, aumentam a atividade de enzimas que participam da gliconeogênese. Os glicocorticóides aumentam a deposição de glicogênio no fígado estimulando a atividade da glicogênio-sintetase aumentando a produção de glicose a partir de precursores não glicídeos, como as proteínas. O aumento dos níveis de glicose estimula a liberação de insulina estimulando a lipogênese, levando ao aumento da deposição de lipídeos. A inibição da captação periférica de glicose e a estimulação da lipólise contribuem para a manutenção de um suprimento adequado de glicose para o cérebro, protegendo as funções cerebrais dependentes de glicose (KATZUNG, 1995).

2.2.1.4- EFEITOS CATABÓLICOS

Os glicocorticóides aumentam o catabolismo.

Quantidades suprafisiológicas de glicocorticóides ocasiona fraqueza e redução de massa muscular levando a osteoporose, síndrome de Cushing e redução no crescimento (GOODMAN & GILMAN'S, 1990).

2.2.1.5- EFEITOS ANTINFLAMATÓRIOS E IMUNOSSUPRESSOR

Quando administrados terapêuticamente, os glicocorticóides possuem grandes efeitos antiinflamatórios e imunossupressores através de ações sobre células inflamatórias e mediadores das respostas inflamatórias e imunossupressoras. Essas ações se devem principalmente pela inibição da fosfolipase A₂ e da COX levando a uma diminuição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos.

Imunossupressor: inibição da produção e dos efeitos de interleucina-2, diminuição da ação das células T, redução na atividade dos macrófagos, diminuição da transcrição dos fatores de adesão celular (GOODMAN & GILMAN'S, 1990).

2.2.3- PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

O tempo de meia-vida plasmática do acetato de hidrocortisona ocorre de 60 à 90 minutos.

O acetato de hidrocortisona liga-se 90% a proteínas plasmáticas (albumina).

Um por cento do acetato de hidrocortisona é excretado inalterado na urina (DALE, RANG & RITTER, 1997).

2.2.4- USO TERAPÊUTICO

2.2.4.1- DOENÇAS ENDÓCRINAS

- Insuficiência crônica da glândula: doença de Addison

Ocorre a destruição das glândulas supra-renais, caracteriza-se por fraqueza, fadiga, perda de peso, hipotensão e incapacidade de manter o nível de glicemia em jejum.

- Hiperfunção da glândula: hiperplasia adrenal congênita:

Defeitos específicos na síntese do cortisol, redução ou ausência da atividade da 21-hidroxilase, levando a uma diminuição do cortisol e aumento da secreção de ACTH.

Ocorre superprodução de androgênios pelo ACTH estar elevado.

Hipersecreção de ACTH, por haver tumores ou hiperplasia nodular da supra-renal e produção ectópica de ACTH. As manifestações são associadas ao excesso de glicocorticóides (VILAR *et al.*, 2000).

2.2.4.2- TERAPIA DE HIDROCORTISONA EM DOENÇAS NÃO ENDÓCRINAS

- Artrite;
- Doenças cutâneas;
- Doenças renais;
- Inflamação ocular;
- Tumores malignos;
- Asma;
- Doenças autoimunes (KATZUNG, 1995).

2.2.5- TOXICIDADE

A toxicidade ocorre quando da:

A - Suspensão:

Levando a uma insuficiência da supra-renal.

B - Uso prolongado:

Levando a uma suspensão da função hipófise-supra-renal, acarretando os seguintes sintomas:

- Distúrbios hidroeletrólíticos;
- Úlcera péptica;
- Parada de crescimento;
- Osteoporose – por inibir a atividade dos osteoblastos;
- Ações metabólicas;

- 1 - Síndrome de Cushing iatrogênica;
2 - Distúrbios metabólicos; hiperglicemia e hipertensão arterial (GOODMAN &
3 GILMAN'S, 1990).

4

5 **2.3- ACETATO DE HIDROCORTISONA**

6

7 **2.3.1- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

8

9 Pó cristalino, branco ou praticamente branco, inodoro;

10 Ponto de fusão 200° C com decomposição;

11 Insolúvel em água, levemente solúvel em etanol e clorofórmio (USP 27,
12 2004).

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

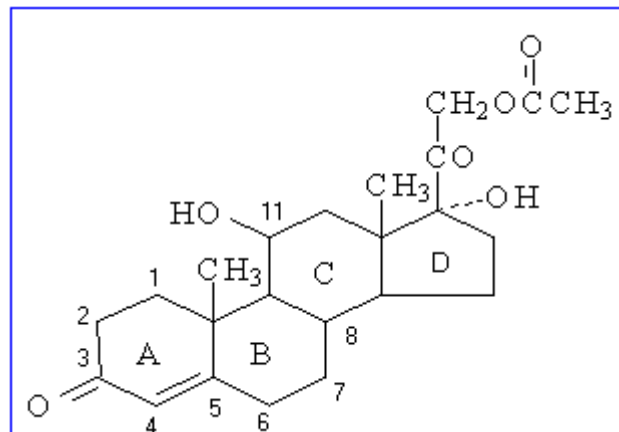
1 2.3.2- RELAÇÃO ESTRUTURA VERSUS ATIVIDADE

2

3 Anel A: ligação dupla 4,5 e a 3-cetona são necessários para a atividade
4 adrenocorticosteróide típica.

5 Anel C: O oxigênio em C11 é indispensável para uma potência
6 antiinflamatória e reguladora dos carboidratos.

7 Outras modificações: irão aumentar ou diminuir a regulação dos eletrólitos
8 (GOODMAN & GILMAN'S, 1990).



9

10 Figura 2: Estrutura do acetato de hidrocortisona. Em A, B, C e D; núcleo
11 ciclopentano peridrofenantreno. Fonte: Goodman & Gilman's, 1990

12

13

14

15

16

17

18

1 2.4- METODOLOGIAS ANALÍTICAS

2

3 Dentre os compêndios oficialmente aceitos, os que descrevem método de
4 análise para o acetato de hidrocortisona matéria-prima e produto acabado são:

5 - United States Pharmacopeia (USP 27, 2004);

6 - British Pharmacopeia 2004 (BP, 2004);

7 - European Pharmacopeia 3^a edição, 1997.

8 Tabela 1: Comparação de métodos analíticos para matéria-prima e produto acabado
9 do AH.

Compêndio	UV	CLAE	Coluna	Fluxo mL/min	Fase móvel	Deteção nm
USP 27 matéria-prima, loção, pomada e creme	Não	Sim	30cm X 5mm ODS	1	Cloreto de butila/cloreto de butila saturada com água/ tetraidrofurano/ Metanol e ácido acético (475:475:70:35:30)	254
BP 2004 (creme e pomada)	Não	Sim	10cm X 5mm ODS	2	Metanol/água (50:50)	240
BP 2004 (matéria- prima)	Não	Sim	25cm X 4,6mm ODS	1	Acetonitrila/água (40:55)	254
USP 27 (pomada e suspensão oftálmica e injetável)	Sim	-	-	-	-	525
Farmacopéia Européia 3 ^a edição (matéria- prima)	Sim	-	-	-	-	241.5
BP 2004 (injetável)	Sim	-	-	-	-	254

10 Fonte: USP 27, BP 2004 & Farmacopéia Européia 3^a edição, 1997.

11 Nota: dados trabalhados pelo autor.

1 Tabela 2: Metodologia analítica para β -ciclodextrina.

Compêndio	CLAE	Coluna	Volume de Injeção (μ L)	Fluxo (mL/min.)	Fase Móvel	Tipo de detector
Farmacopéia Européia 3 ^a edição	Sim	25mm x 4,6mm ODS	50	1,5	Metanol/ Água (10:90)	Índice de refração

2 Fonte: Farmacopéia Européia 3^a edição, 19973
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

1 2.5- CICLODEXTRINA

2

3 2.5.1- ADJUVANTE DE SOLUBILIZAÇÃO

4

5 As ciclodextrinas têm sido reconhecidas como um novo grupo de excipientes
6 farmacêuticos úteis (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). São utilizadas em
7 formulações oral e tópica para melhorar a estabilidade química e física, a
8 biodisponibilidade e reduzir a incidência de efeitos adversos de diversas substâncias
9 ativas (SHEN *et al.*, 2005).

10 São oligossacarídeos cíclicos com grupos hidroxil na superfície e com uma
11 cavidade no centro. São derivadas da hidrólise enzimática do amido, através da
12 ciclodextrinaglicosil-transferase (CGT), uma enzima sintetizada por vários
13 microorganismos. Possui grupos hidrofílicos na superfície e grupos lipofílicos no
14 centro (cavidade). Esses grupos que estão na cavidade permitem formar complexos
15 com muitos compostos, insolúveis em água e a parte hidrofílica forma complexos
16 solúveis em água (LOFTSSON, MATHIASSEN & MÅSSON, 2003)

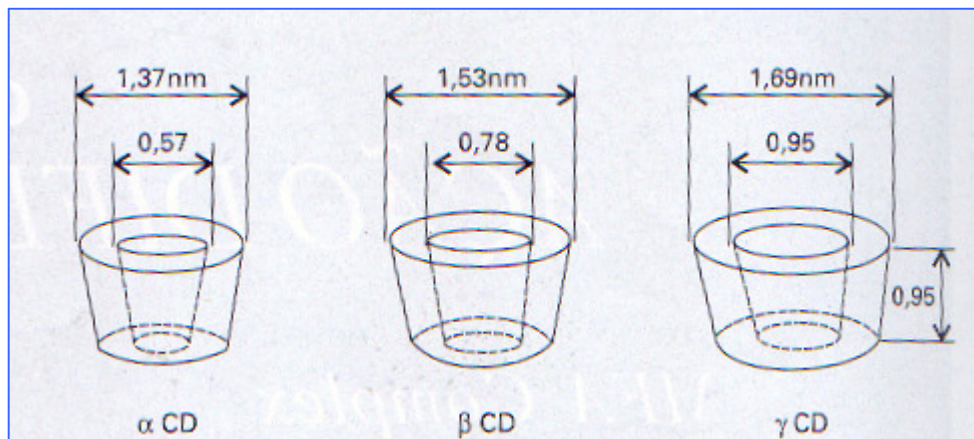
17 As ciclodextrinas possuem uma forma de cone truncado (toroidal) com uma
18 cavidade interior cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades
19 de glicose. Esse interior é relativamente apolar, comparado com a água, servindo
20 como local para a entrada de substâncias apolares que encontram um sítio
21 hidrofóbico adequado à formação de complexos de inclusão molecular (FROMMING
22 & SZEJTLI, 1994 apud MATIOLI, MORES & ZANIN, 2000).

23

24

25

26



1

2 Figura 3: Forma e dimensões moleculares das ciclodextrinas naturais: α, β e γ
3 ciclodextrina. Fonte: CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995.

4

5 A ciclodextrina promove um “aprisionamento” de compostos sem formação de
6 ligações covalentes. A molécula presa pode estar totalmente ou parcialmente
7 contida na cavidade. A ligação da molécula dentro da cavidade da ciclodextrina não
8 é fixa ou permanente e está submetida a um equilíbrio dinâmico
9 (KRISTMUNDSDÖTTIR, LOFTSSON & HOLBROOK, 1996).

10 As ciclodextrinas mais conhecidas são alfa, beta e gama (α, β e γ)
11 ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que
12 adotam a conformação de cadeira. A dimensão da cavidade é determinada pelo
13 número de unidades de glicose constituintes da ciclodextrina, como demonstrado na
14 figura 4 (BRITTO, JÚNIOR & SANTOS, 2004).

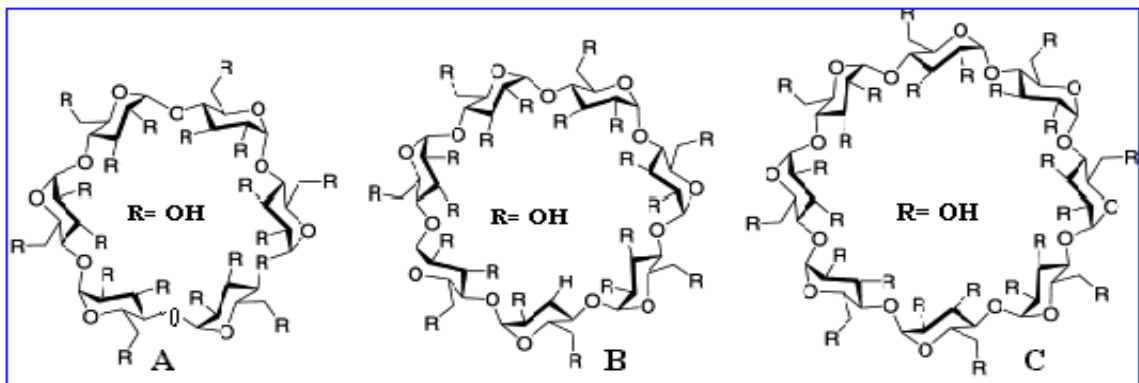
15

16

17

18

19

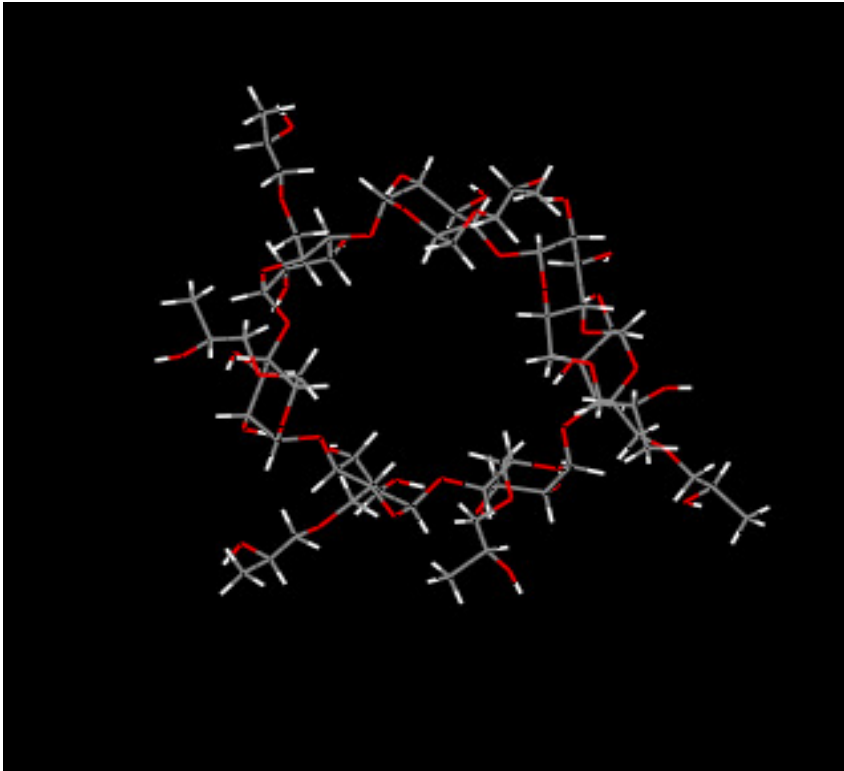


1
2 Figura 4: Estruturas de ciclodextrinas naturais: A- α -ciclodextrina; B- β -ciclodextrina;
3 C- γ - ciclodextrina. Fonte: Vijay *et al.*, 2003.

4
5 As ciclodextrinas naturais possuem solubilidade em água limitada, porém, um
6 aumento significativo de sua solubilidade em água é obtida pela alquilação de
7 grupos hidroxil, resultando em derivados hidroxialquil, metil e sulfobutil (VENTURA *et*
8 *al.*, 2005).

9 Derivados hidroxialquilados de ciclodextrina, como a hidroxipropil beta-
10 ciclodextrina (HP β CD) possuem alta solubilidade em água, baixa toxicidade e baixo
11 custo, conforme mostra a figura 5 (ARCHONTAKI, VERTZONI & MALAKI, 2001;
12 RUAN *et al.*, 2005).

13
14
15
16
17
18
19
20



1

2 Figura 5: Estrutura da HPβCD, visão frontal, grau de substituição 7. Modelo de linha,
 3 onde os átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio estão representados em cor
 4 cinza, branco e vermelho, respectivamente. Fonte: WebLab ViewerLite 4.0.

5

6 Tabela 3: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas e seus derivados:

PROPRIEDADES	ALFA	BETA	GAMA	HPβCD
Unidades de glicose	6	7	8	7
Massa Molecular	972	1135	1297	1300
Solubilidade em água (g/100 mL) 25°C	14.5	1.85	23.2	>50
Diâmetro interno da cavidade (mm)	47.53	60.65	75.83	60
Diâmetro externo da cavidade (mm)	146	154	175	-
Ponto de Fusão (°C)	275	280	275	-

7 Fonte: MATIOLI, MORES & ZANIN, 2000.

8

1 A inclusão de moléculas dentro da cavidade das ciclodextrinas pode protegê-
2 las do meio externo, podendo ser usadas para aumentar a estabilidade das
3 moléculas susceptíveis à degradação e aumentar a solubilidade em solventes
4 aquosos (DAVIES; WANG & TUCKER, 1997).

5 Os complexos de inclusão são estabilizados por várias forças
6 intermoleculares, tais como: Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações
7 dipolo-dipolo.

8 Os compostos de inclusão formados pelas ciclodextrinas são cristalinos e
9 apresentam propriedades mais interessantes em relação à molécula de origem
10 (MATIOLI, MORES & ZANIN, 2000).

11 As principais aplicações farmacêuticas das ciclodextrinas são:

- 12 - Aumento da solubilidade do fármaco (RAJEWSKI & STELA, 2001);
- 13 - Aumento da estabilidade do fármaco contra hidrólise, oxidação e fotólise
14 (LOFTSSON & BREWSTER, 1996);
- 15 - Aumento na biodisponibilidade do fármaco (SMITH & MAIBACH, 1995);
- 16 - Liberação controlada do fármaco;
- 17 - Correção do sabor e odor desagradáveis dos fármacos;
- 18 - Prevenção das interações fármaco/fármaco e ou fármaco/excipientes (BEKERS,
19 UIJTENDAAL & BEIJNEN, 1991).

20 A dissociação de substâncias ativas de dentro da cavidade de ciclodextrinas
21 não deve ser um fator limitante para sua aplicação, pois esse fenômeno ocorre
22 rapidamente, com tempo de meia-vida da substância incluída na faixa entre mili à
23 micro –segundos (STELLA *et al.*, 1999).

1 É reconhecido que as ciclodextrinas atuam como verdadeiros carreadores
2 mantendo as moléculas do fármaco hidrofóbico em solução e liberando-os na
3 membrana biológica. A membrana relativamente lipofílica têm baixa afinidade por
4 moléculas de ciclodextrinas hidrofílicas e por isso elas permanecem no exterior
5 aquoso das membranas (MÁSSON *et al.*, 1999).

6 Substâncias com baixa solubilidade em água como corticóides, podem formar
7 complexos de inclusão através de ligação não covalente com ciclodextrinas
8 (FORGO, VINCZE & KOVER, 2003).

9 Ésteres de corticóides são passíveis de hidrólise, representando um problema
10 na sua estabilidade; um método racional para otimizar esse problema é a formação
11 de complexos de inclusão em ciclodextrinas (LEMESLE-LAMACHE *et al.*, 1996 apud
12 ZINGONE & RUBESSA, 2005).

13 Foram verificados na literatura trabalhos que promoviam o aumento da
14 solubilidade da hidrocortisona pela complexação com a hidroxipropil beta-
15 ciclodextrina (KRISTMUNDSDÖTTIR, LOFTSSON & HOLDBROOK, 1996).

16 Greié e colaboradores demonstraram a inclusão do acetato de hidrocortisona
17 em hidroxipropil β -ciclodextrina utilizando a preparação do complexo pelo método de
18 secagem por pulverização (spray-drying) (GREIÉ *et al.*, 2000).

19 Foi recentemente desenvolvido e validado um método de cromatografia
20 líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com detector de UV para a
21 determinação, na formulação creme, da substância ativa AH e seus produtos de
22 degradação (hidrocortisona e acetato de cortisona), assim como conservantes
23 metilparabeno e propilparabeno, tendo a dexametasona como padrão interno. A fase

1 móvel otimizada para a separação de todos os compostos foi utilizando: metanol,
2 acetonitrila e água (15:27:58) (HÁJKOVA *et al.*, 2003).

3 A preparação de uma solução oftálmica de hidrocortisona 1% preparada pela
4 adição de HP β CD 69,4 mM com agitação e aquecimento à 30°C está descrita na
5 literatura (BARY, TUCKER & DAVIES, 2000).

6

7 **2.5.2- REQUISITOS PARA A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS**

8

9 Antes de estudar a formação de complexos é bom verificar a sua viabilidade,
10 pois nem toda substância pode ser complexada ou não se verifica nenhuma
11 vantagem farmacotécnica no método. Pode-se enumerar assim alguns fatores
12 limitantes à complexação de fármacos (LOFTSSON & BREWSTER, 1996):

13 - Propriedades físico-químicas da molécula hóspede: para que a complexação
14 ocorra, e dela resulte um complexo estável, o estudo da molécula de ciclodextrina e
15 de suas propriedades físico-químicas somente, não garantem êxito na obtenção. O
16 método de obtenção deve compreender também o estudo da substância hóspede,
17 esta deve reunir alguns quesitos necessários à sua inclusão (SZEJTLI, 1988).

18 - Compatibilidade geométrica: o tamanho e a geometria da molécula a serem
19 incluídas na ciclodextrina devem ser adequados para a cavidade apolar. Em geral
20 fármacos com peso molecular entre 200 e 800 g/mol são passíveis de inclusão em
21 uma das três cavidades (α , β e γ) (WALECZEK *et al.*, 2003 apud ZIGONE &
22 RUBESSA, 2005).

23 - Polaridade: em geral moléculas hidrofóbicas tem maior afinidade pela cavidade da
24 ciclodextrina quando em solução aquosa, para que ocorrendo a associação, se

1 dissocie em menor extensão (LOFTSSON & PETERSEN, 1998 ; ZHENMING *et al.*,
2 2003 ; MURA MAESTRELLI & CIRRI, 2003).

3 - Constante de estabilidade do complexo de inclusão (K_s): essa constante de
4 equilíbrio indica se a molécula está mais associada (protegida no interior da
5 cavidade da ciclodextrina) ou dissociada (livre em solução). Seu valor numérico é
6 diretamente proporcional a associação da molécula hóspede no interior da
7 ciclodextrina (HARRIS, 1995 ; LOFTSSON & BREWSTER, 1996). É um parâmetro
8 importante na avaliação da afinidade e o grau de ligação das moléculas com a
9 ciclodextrina. Um método frequentemente usado para a determinação da K_s é o
10 método de diagrama de solubilidade de fases segundo Higuchi & Connors, 1965
11 (UGWU *et al.*, 1999).

12 - Toxicidade: quando administradas oralmente as ciclodextrinas mostram-se
13 inofensivas, devido a insignificante quantidade absorvida (SZATHMARY *et al.*, 1990
14 apud MATIOLI, MORES & ZANIN, 2000).

15

16

17

18

19

20

21

22

23

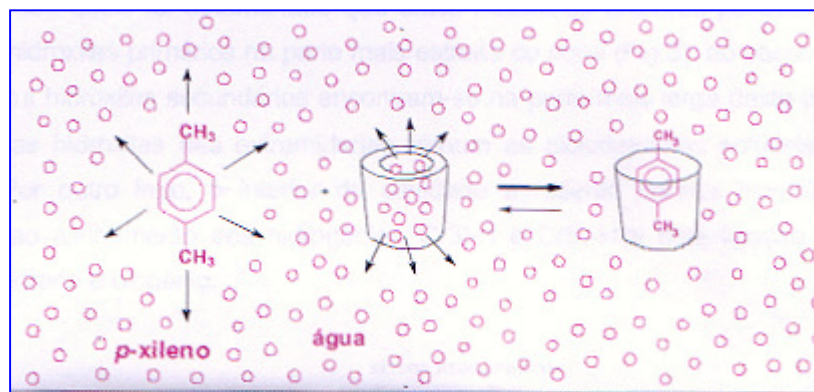
24

1 2.5.3- MECANISMO DE COMPLEXAÇÃO

2

3 A cavidade hidrofóbica, das ciclodextrinas em solução aquosa, está
4 preenchida por moléculas de água. Devido ao microambiente termodinamicamente
5 desfavorável (interação polar-apolar), essas moléculas de água tendem a sair e
6 entrar sem dificuldade. Contudo, uma molécula hóspede específica, quando
7 adicionada à solução de ciclodextrina, expulsa as moléculas de água e ocupa a
8 cavidade (TABUSHI, 1982 apud MATIOLI, MORES & ZANIN, 2000).

9



11

12 Figura 6: Representação esquemática da formação do complexo de inclusão.

13 O p-xileno é a molécula hóspede. Fonte: CITERNESI & SCIACCHITANO, 1995.

14

15 A dissociação de moléculas da cavidade das ciclodextrinas ocorre
16 rapidamente, com um tempo de meia-vida das moléculas na cavidade da
17 ciclodextrina em torno de mili a micro segundos ou menor, independentemente da
18 molécula e de sua constante de estabilidade. A liberação de moléculas da cavidade
19 da ciclodextrina não deve ser um fator limitante (STELLA *et al.*, 1999).

20

1 2.5.4- PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS

2

3 Não existe um método único que se aplique a todos os procedimentos de
4 complexação. O método de preparação deve considerar: o rendimento, a
5 simplicidade e a rapidez (MURA, MAESTRELLI & CIRRI, 2003).

6 Os métodos de preparação podem ser divididos em fase: líquida, semi-sólida
7 e sólida. Os métodos que apresentam os melhores resultados são os obtidos em
8 fase líquida (MURA, MAESTRELLI & CIRRI, 2003).

9 Os métodos em fase líquida são classificados em:

10 - Co-precipitação: baseia-se no diagrama de solubilidade de fases. Se neste estudo
11 for determinada a formação de complexo menos solúvel no meio (tipo Bs ou Bi), é
12 bem possível que se possa separá-lo por precipitação. Pode demandar dias ou até
13 semanas para que o equilíbrio seja alcançado e o complexo precipite
14 espontaneamente, sob agitação (figura 6).

15 - Neutralização: consiste em obter complexos de moléculas ácidas ou básicas em
16 ciclodextrinas, as quais precipitam com a neutralização. As moléculas hóspedes não
17 podem ser afetadas com a alteração de pH.

18 - Liofilização: com o uso de quantidades estequiométricas, pode-se obter complexos
19 com soluções de ciclodextrinas com a molécula hóspede e posterior liofilização.
20 Essa técnica é rápida e tem bom rendimento, porém pode haver dificuldade em
21 caracterizar o complexo formado que se apresenta como um pó amorfo.

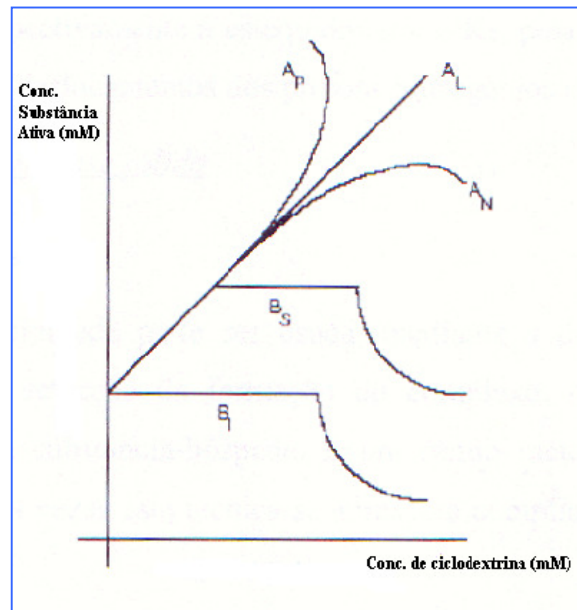
22 - Secagem por pulverização (spray-drying): esse método não é adequado para
23 substâncias termolábeis.

24

2.5.5- CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

A caracterização dos complexos de inclusão, em solução baseia-se em alterações físico-químicas da molécula incluída (SINGH & AITHAL, 1998). A detecção dos complexos de inclusão em ciclodextrina pode ser realizada conforme se apresenta o complexo. Para complexos em fase líquida os métodos mais usados são:

- Solubilidade de fases: é o método mais comum no estudo de complexação e foi descrito por (HIGUCHI & CONNORS, 1965). Fundamenta-se nas alterações da solubilidade da molécula hóspede pela adição de ciclodextrina. A molécula hóspede é adicionada em excesso a várias concentrações crescentes de ciclodextrina. As diferentes amostras são submetidas à agitação e, após ter sido alcançado o equilíbrio, são filtradas. A concentração da molécula hóspede é determinada. O diagrama de solubilidade é construído com a representação gráfica da concentração da molécula hóspede em função das concentrações de ciclodextrina. Conforme o gráfico obtido classifica-se o complexo formado em A (aumento da solubilidade) e B (queda da solubilidade).



1

2 Figura 7: Diagrama de solubilidade de fases; A_P- aumento de solubilidade com
 3 desvio positivo; A_L- aumento de solubilidade linear; A_N- aumento de solubilidade com
 4 desvio negativo; B_S- redução de solubilidade com complexo pouco solúvel; B_I-
 5 redução de solubilidade com complexo insolúvel. Fonte: HIGUCHI & CONNORS,
 6 1965.

7

8 Esses dados do gráfico permitem calcular a estequiometria e a constante de
 9 estabilidade (K_s) do complexo de inclusão formado (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

10 - Espectroscopia de UV-Visível: ocorrem alterações espectroscópicas durante a
 11 complexação, como desvios e ou aumento na absorção (SZEJTLI, 2001).

12 - Microscopia eletrônica de varredura: essa técnica é muito usada no estudo da
 13 morfologia dos complexos de inclusão de sólidos. Como o estado cristalino do
 14 complexo é diferente do obtido de uma simples mistura física, pode-se avaliar a
 15 extensão da complexação (MURA, MAESTRELLI & CIRRI, 2003).

16 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): o RMN de H¹ é uma
 17 técnica muito usada, e é a que apresenta os resultados mais confiáveis.

1 O método fundamenta-se nas interações dipolares entre os prótons da
2 molécula hóspede e H-3 e H-5 da cavidade da ciclodextrina, provendo informações
3 estruturais mais detalhadas. Os átomos de H-3 e H-5 apresentam desvios químicos
4 para níveis mais altos (HARRIS, 1995 ; FORGO & GONDOS, 2002). Muitas técnicas
5 têm sido empregadas para elucidar a natureza e o tipo de interação, mas somente o
6 RMN é capaz de diferenciar a parte da molécula do analito envolvida na interação
7 com a cavidade da ciclodextrina (MARTÍN *et al.*, 2003).

8 - Análise Térmica: é um importante método na investigação dos complexos de
9 inclusão em ciclodextrinas. A inclusão da molécula hóspede na cavidade da
10 ciclodextrina faz com que os pontos de fusão, ebulição e sublimação ou de
11 degradação, sejam deslocados para um máximo dos valores de decomposição da
12 ciclodextrina, o que permite diferenciar uma simples mistura física de um complexo
13 de inclusão. Técnicas como a calorimetria diferencial de varredura (DSC),
14 termogravimetria (TG) e a termogravimetria diferencial (DTG) são exemplos de
15 análises térmicas que podem ser usadas no estudo de complexação (VIANNA *et al.*,
16 1998).

17 - Difração de Raios-X: a variação na cristalinidade pode ser usada, mediante a
18 difração de raios-X do complexo em pó, para a detecção da formação do complexo,
19 de sua estrutura e as interações entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. É um
20 ótimo método para o estudo da complexação, porém algumas vezes essa técnica
21 apresenta complicações, principalmente quando a concentração de uma das
22 moléculas em estudo estiver em uma concentração bem superior a outra (BEKERS
23 *et al.*, 1991).

1 - Espectroscopia de Infravermelho (IV): a caracterização dos complexos pode ser
2 avaliada principalmente nos deslocamentos que ocorrem nas bandas da
3 ciclodextrina, por efeito de interações entre grupos de átomos da molécula da
4 substância hóspede e da ciclodextrina. Por meio da sobreposição das bandas faz-se
5 a caracterização ou não dos complexos (UEKAMA & OTAGIRI, 1987).

6

7 **2.6- FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS**

8

9 **2.6.1- SOLUÇÃO**

10

11 É uma preparação líquida que contém uma ou mais substância dissolvida em
12 um solvente adequado ou em uma mistura de solventes mutuamente miscíveis
13 (DAR, 1981).

14 A administração de fármacos na forma de solução geralmente implica em
15 absorção no trato gastro intestinal e liberação para a circulação sistêmica, devendo
16 este processo ocorrer mais rapidamente em solução do que em uma suspensão.

17 Além do fármaco as soluções contêm outros solutos. Estes geralmente são
18 adicionados para corar, aromatizar, edulcorar ou conferir estabilidade.

19 Ao se formular uma solução é preciso ter informações sobre a solubilidade e a
20 estabilidade de cada um dos solutos presentes, em relação ao solvente empregado.
21 Deve-se evitar combinações que ocasionem interações químicas ou físicas que
22 possam afetar a qualidade terapêutica ou a estabilidade farmacêutica do produto
23 (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

24

2.6.1.1- XAROPES

São preparações aquosas concentradas de açúcar ou de substitutos, com ou sem acréscimo de flavorizantes e princípios ativos. Os xaropes são uma forma líquida de um fármaco capaz de mascarar um sabor desagradável de certa substância. São particularmente eficazes na administração de medicamentos em jovens, pois seu sabor agradável em geral dissipa relutâncias. Além disso, o fato de os xaropes conterem pouco ou nenhum álcool aumenta a sua aceitação por parte dos pais.

A maioria dos xaropes contém além da água purificada e dos fármacos os seguintes componentes: açúcar, geralmente sacarose ou seus substitutos, usados para tornar o produto doce e viscoso, conservantes antimicrobianos, flavorizantes e corantes. Pode conter ainda solventes especiais, agentes solubilizantes, espessantes ou estabilizantes.

Entre os conservantes mais usados em xaropes com as concentrações eficazes estão o ácido benzóico (0,1 a 0,2%), o benzoato de sódio (0,1 a 0,2%) e várias combinações de metil, propil e butilparabeno em um total de 0,1% (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Soluções aquosas edulcoradas de ciclodextrinas precisam ser preservadas para prevenir contaminação com microorganismos, particularmente se eles são utilizados em aplicações de dose múltipla (LEHNER, MULLER & SEYDEL, 1994).

2.6.1.1.1- PREPARAÇÃO DOS XAROPES

Existem quatro métodos possíveis de preparação dos xaropes, dependendo das características físicas e químicas dos componentes. Em termos gerais esses métodos são:

- Dissolução dos componentes com ajuda de calor: são preparados por esse método quando se deseja rapidez e quando seus componentes não são prejudicados ou volatilizados pelo aquecimento. Segundo esse método o açúcar é acrescentado à água purificada, e aplica-se calor até que se obtenha a solução. A seguir, são acrescentados outros componentes termoestáveis ao xarope quente; deixa-se a mistura esfriar e o seu volume é ajustado até o nível adequado com adição de água purificada. O uso de calor facilita a dissolução rápida do açúcar e de outros componentes dos xaropes; no entanto, não se deve usar calor em excesso. A sacarose, que é um dissacarídeo, pode ser hidrolisada e convertida em monossacarídeos, dextrose (glicose) e frutose (levulose). Essa reação hidrolítica é conhecida como inversão, e a combinação dos dois monossacarídeos como açúcar invertido. Quando se aplica calor na preparação de um xarope como a sacarose, é quase certo que ocorra alguma inversão da sacarose. Quando o xarope é superaquecido, torna-se âmbar, devido a caramelização da sacarose. Os xaropes assim decompostos são mais susceptíveis à fermentação e ao desenvolvimento de microorganismos do que os não decompostos, que são mais estáveis.

- Dissolução por agitação sem aquecimento:

Para evitar a inversão da sacarose induzida pelo aquecimento, o xarope pode ser preparado apenas por agitação. Em pequena escala, a sacarose e outros

1 componentes da fórmula podem ser dissolvidos em água purificada colocando-se as
2 matérias-primas num recipiente de maior capacidade que o volume do xarope, o que
3 permite a perfeita agitação da mistura. Esse processo é mais demorado, mas o
4 produto tem maior estabilidade. Sempre que for preciso acrescentar componentes
5 sólidos a um xarope, é melhor dissolvê-los numa quantidade mínima de água
6 purificada e depois incorporar a solução resultante ao xarope. Quando
7 acrescentados diretamente, os componentes sólidos se dissolvem lentamente, visto
8 que a natureza viscosa do xarope não permite que se distribuam rapidamente pelo
9 xarope.

10 Existe ainda outro método de preparação de xarope: acréscimo de sacarose a
11 um líquido medicinal já preparado ou a um líquido flavorizado (ANSEL, POPOVICH
12 & ALLEN, 2000).

13 O xarope simples é preparado por meio da dissolução de 85 g de sacarose em
14 água purificada suficiente para produzir 100 mL de xarope (USP27, 2004).

15

16 **2.6.1.1.2- FATORES QUE AFETAM A SOLUBILIDADE DE UMA SUBSTÂNCIA** 17 **E INTERFEREM NA FORMULAÇÃO**

18

19 Estado físico do sólido: a forma cristalina ou amorfa do sólido é importante para a
20 formulação. As substâncias polimórficas têm dois ou mais pontos de fusão e
21 diferentes coeficientes de solubilidade. Em geral, as substâncias polimórficas são
22 mais instáveis, tendem por isso a converterem-se na sua forma estável, que
23 geralmente se caracteriza por ter ponto de fusão mais elevado e menor coeficiente
24 de solubilidade. Além das formas polimórficas podem existir as formas amorfas. A

1 energia necessária para que uma molécula do fármaco seja mudada da forma
2 cristalina é muito maior que a necessária para que não seja um pó amorfo. Portanto,
3 a forma amorfa é sempre mais solúvel que a forma cristalina correspondente
4 (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

5 Estado de divisão e agitação: como o mecanismo da dissolução implica uma
6 ação de superfície, é evidente que quanto menores as partículas do soluto, maior
7 será a área deste em contato com o solvente, por isso uma substância em pó será
8 mais rapidamente dissolvida em igualdade de condições do que se estiver sob a
9 forma de grandes cristais. É visto que quanto mais dividido estiver o sólido a
10 dissolver mais rapidamente se obterá a sua dissolução. A agitação da mistura
11 soluto-solvente exerce uma influência marcante na velocidade de dissolução de um
12 sólido. A dissolução dependerá de seu coeficiente de difusão no solvente, o qual
13 pode ser aumentado pela agitação da mistura. Quanto maior a velocidade, maior o
14 volume de solvente em contato com o soluto (VOIGT, 1982).

15 Constante dielétrica do solvente: quanto mais polar for uma substância maior
16 será a constante dielétrica. Pode-se dizer que compostos altamente polares ou
17 ionizáveis se dissolverão em líquidos de elevada constante dielétrica, ao passo que
18 compostos apolares se dissolvem em solventes com baixa constante dielétrica
19 (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

20 pH: Vários compostos químicos dotados de importantes propriedades
21 terapêuticas, pelo fato de se comportarem como ácidos ou bases fracas são muito
22 pouco ou quase insolúveis na água, podendo então, assumirem dentro de limites
23 bem definidos de pH a forma de íons, geralmente hidrossolúveis (PRISTA, ALVES &
24 MORGADO, 1991).

25

2.7- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para determinar a quantidade de uma substância em uma formulação ou para se determinar o teor de uma matéria-prima, deve-se realizar o doseamento segundo método farmacopéico ou validado para este fim.

A quantificação por CLAE tem sido adotada por ser uma metodologia bastante versátil e prática, podendo ser totalmente automatizada. Esta técnica emprega colunas recheadas de materiais especialmente preparados (fase estacionária) e uma fase móvel que é eluída sob pressão. A CLAE tem a capacidade de realizar separações de vários compostos presentes em diversos tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES, 1997).

Existe descrito na literatura, ensaio por CLAE para a separação e determinação do acetato de hidrocortisona em solução aquosa, enxaguatório bucal (KRISTMUNDSDÖTTIR, LOFTSSON & HOLBROOK, 1996).

Propriedades como massa molecular, solubilidade, estrutura e pKa devem ser consideradas ao se escolher a melhor condição cromatográfica para a separação dos componentes de uma determinada amostra.

A fase móvel deve ter alto grau de pureza, dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade, ser compatível com o detector utilizado, ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

Há cinco tipos diferentes de CLAE: por adsorção, por partição, com fase ligada (fase normal ou reversa), por exclusão e por troca iônica. Essas diferenças

1 são determinadas pelo tipo de fase estacionária utilizada. A cromatografia por
2 adsorção se baseia na competição que existe entre as moléculas da amostra e as da
3 fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária. A
4 cromatografia por partição, também chamada de líquido-líquido, utiliza uma fase
5 estacionária de água em sílica e a fase móvel orgânica. Seu mecanismo de
6 separação baseia-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na
7 fase móvel e estacionária. Os componentes com maior afinidade pela fase
8 estacionária serão seletivamente retidos, enquanto os que tiverem menor afinidade
9 serão transportados mais rapidamente pela fase móvel (GUIMARÃES & COLLINS,
10 1997).

11 A cromatografia por exclusão efetua a separação de acordo com o tamanho
12 das moléculas. O tamanho dos poros da coluna é controlado a fim de que se tenham
13 moléculas pequenas (de baixo peso molecular) percorrendo um trajeto maior e
14 apresentando um maior tempo de retenção, e as moléculas maiores não penetram
15 em todos os poros e são eluídas mais rapidamente (CASS & REGANI, 2001).

16

17

2.8- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA QUANTITATIVA

Para se empregar algum dos vários métodos existentes para o ensaio de teor de qualquer amostra é preciso possuir resultados confiáveis e garantidos. Para isto, realiza-se a validação do método analítico objetivando-se a produção de resultados com confiabilidade.

Validar é estabelecer evidências documentadas que garantam que um determinado procedimento irá reproduzir resultados de acordo com especificações pré-determinadas (CDER/FDA, 2000).

Algumas características da validação que são geralmente recomendadas pela USP variam de acordo com o tipo de teste como está demonstrado a seguir de acordo com os parâmetros da USP 27, ICH , 1997 & RE N° 899 de 29/05/2003.

Tabela 4: Comparação dos parâmetros de validação de método analítico quantitativo categoria I (USP 27, 2004; ICH, 1997 & RE N° 899 de 29/05/2003).

TESTES	USP 27	ICH	RE 899
EXATIDÃO	SIM	SIM	SIM
PRECISÃO	SIM	SIM	SIM
ESPECIFICIDADE	SIM	SIM	SIM
LIMITE DE DETECÇÃO	NÃO	NÃO	NÃO
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	SIM	NÃO	NÃO
LINEARIDADE	SIM	SIM	SIM

Fonte: SHABIR *et al.*, 2003. Nota: dados trabalhados pelo autor.

1 A validação para métodos cromatográficos de ensaio de teor enquadra-se na
2 categoria I das diretrizes da ANVISA para guia de validação de métodos analíticos e
3 bioanalíticos (BRASIL, 2003).

4 5 **2.8.1- LINEARIDADE**

6
7 Avaliar se os resultados possuem uma proporção direta às concentrações das
8 substâncias em estudo dentro de um intervalo. Para o estudo da linearidade, faz-se
9 necessário a confecção de uma curva padrão (LEITE, 2002).

10 A linearidade deve ser determinada por no mínimo 5 concentrações diferentes
11 (80%-120% da concentração teórica) na curva padrão. A relação linear dos
12 resultados do testes deverão ser tratados para a determinação do coeficiente de
13 correlação (r), da inclinação da reta (a) do coeficiente angular (b), onde $y = ax + b$. O
14 critério mínimo aceitável do (r) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

15 16 **2.8.2- PRECISÃO**

17
18 A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série
19 de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Podendo ser
20 expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de
21 variação (CV%) de uma série de medidas. Não admitisse valores superiores a 5%
22 (BRASIL, 2003).

23

24

2.8.3- EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra (BRASIL, 2003). Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo.

2.8.4- ESPECIFICIDADE

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) 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. Quando a impureza ou o produto de degradação não estiver disponível, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (BRASIL, 2003).

23 2.8.5- INTERVALO

24

25 É o limite de quantificação superior e inferior de um método analítico, é
 26 derivado do estudo da linearidade, estabelecido pela confirmação da exatidão,
 27 precisão e linearidade do método, quando aplicados as amostras (BRASIL, 2003).

28

29 2.8.6- ROBUSTEZ

30

31 É a capacidade de um método analítico de resistir a pequenas variações dos
 32 parâmetros analíticos. Indica a sua confiança durante o uso normal.

33

34 Tabela 5: Fatores a serem considerados na determinação da robustez

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
Espectrofotometria	Varição do pH da solução
	Temperatura
	Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Varição do pH da fase móvel
	Varição da composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste

35 Fonte: Brasil, 200

36

37

38

39

40

41 **III- OBJETIVOS**

42

43 **3.1- OBJETIVOS GERAIS**

44

45 - Desenvolver o complexo de inclusão do acetato de hidrocortisona (AH) em
46 ciclodextrinas.

47

48 - Propor o desenvolvimento de uma formulação líquida oral do acetato de
49 hidrocortisona .

50

51 - Estabelecer e validar a metodologia de análise quantitativa com detecção dos
52 produtos de degradação.

53

54

55 **3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

56

57 - Determinar a estequiometria e a constante de estabilidade (Ks) do complexo de
58 inclusão formado.

59

60 - Aumentar a solubilidade em água do acetato de hidrocortisona (AH).

61

62 - Obter o melhor percentual de inclusão para a formação do complexo de inclusão
63 com a gama ciclodextrina e com a hidroxipropil beta-ciclodextrina (HP β CD).

64

65

66

67

68

69

70 - Caracterizar o complexo de inclusão formado pelas técnicas de espectrofotometria
71 UV, Infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância
72 Magnética Nuclear de H^1 (RMN), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e
73 difração de raios-X.

74

75 - Propor um modelo de modelagem molecular das possibilidades de estruturas do
76 complexo de inclusão.

77

78 - Desenvolver uma formulação líquida oral de acetato de hidrocortisona (AH)
79 complexado com ciclodextrina, para auxiliar no tratamento de hiperplasia adrenal
80 congênita, facilitando a administração desse medicamento em crianças.

81

82

83 **IV- MATERIAIS E MÉTODOS**

84

85 **4.1- PLANEJAMENTO**

86

87 A dissertação teve caráter multidisciplinar, sendo realizada no Departamento
88 de Medicamentos da Faculdade de Farmácia, no Núcleo de Pesquisa de Produtos
89 Naturais (NPPN), Instituto de Química (UFRJ), COPPE (UFRJ) e Fundação Oswaldo
90 Cruz.

91

92 **4.1.1- DEPARTAMENTO DE MEDICAMENTOS**

93

94 4.1.1.1- Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos-
95 LabCQ-realização dos seguintes testes:

96

97 Testes de controle de qualidade físico-químico da matéria-prima acetato de
98 hidrocortisona e produto acabado.

99 Validação da metodologia analítica quantitativa por CLAE para a solução oral
100 de acetato hidrocortisona e seus produtos de degradação.

101 Desenvolvimento dos complexos de inclusão do acetato de hidrocortisona em
102 ciclodextrinas.

103 Caracterização dos complexos de inclusão por espectroscopia de
104 Infravermelho com transformada de Fourier.

105

106

1 4.1.1.2- Instituto de Química – Departamento de Química Orgânica –
2 Laboratório de modelagem molecular (Profa. Magaly Girão Albuquerque).

3
4 Desenvolvimento da proposta da modelagem molecular para a formação do
5 complexo de inclusão do AH/HP β CD.

6
7 4.1.1.3- Farmácia Universitária da UFRJ

8
9 Desenvolvimento da formulação líquido oral de acetato de hidrocortisona.

10
11 4.1.1.4- PEMM/COPPE/UFRJ – Laboratório de Microscopia Eletrônica (Márcia
12 Soares Saden) e Núcleo de Catálise.

13
14 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X.

15
16 4.1.1.5- Fundação Oswaldo Cruz - Farmanguinhos (Altivo Pitalunga e Rafael
17 Cardoso Seiceira)

18
19 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) das amostras.

20
21 4.1.1.6- Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN)

22
23 Liofilização do complexo de inclusão do AH/HP β CD e a análise de
24 ressonância magnética nuclear de H¹.

1 **4.2- MATERIAIS**

2

3 **4.2.1- REAGENTES**

4

5 - 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (Cargill)

6 - Gama ciclodextrina (American Maize-Products Company)

7 - Acetonitrila para CLAE

8 - Água Destilada

9 - Metanol para CLAE

10 - Etanol P.A.

11 - Tampão fosfato pH 6,5

12 - Acetato de hidrocortisona padrão (Sigma®)

13 - Acetato de hidrocortisona matéria-prima (Galena®)

14 - Açúcar branco

15 - Sorbato de potássio

16 - Metilparabeno

17 - Dimetilsulfóxido (DMSO)

18

19

20

21

22

23

24

1 4.2.2- EQUIPAMENTOS

2

3 - Balança analítica Mettler Toledo AG 204

4 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu

5 - Destilador Quimis

6 - Potenciômetro Digimed DME CV 4

7 - Espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC

8 - Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu-

9 FTIR8300

10 - Estufa Quimis-Q3178 SE

11 - Polarímetro Schmidt + Haensch NH8

12 - Ponto de fusão Buchi B-540

13 - Banho-maria com agitação

14 - Liofilizador Labconco modelo: 603886

15 - Banho termostático Thornton T14

16 - Placa com aquecimento e agitação

17 - Calorímetro Diferencial de Varredura

18 - Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)-JEOL JSM 6460 LV 15Kv

19 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker – spectrospin modelo:
20 DRX 400

21 - Difratorômetro de raios-X Rigaku modelo Miniflex

22

23

24

25

1 4.2.3- VIDRARIAS E OUTROS

2

3 - Cubetas de quartzo com capacidade de 3 mL, caminho óptico de 1 cm

4 - Bureta 10,0 mL

5 - Balões volumétricos

6 - Béqueres pyrex

7 - Frascos erlenmeyer com tampa

8 - Papel alumínio

9 - Seringa descartável de 5 mL

10 - Barra magnética

11 - Filtro de membrana 0,45 μm

12 - Gral e pistilo

13 - Pipetas automáticas Eppendorf

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 4.3- MÉTODOS

2

3 4.3.1- ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA

4

5 4.3.1.1- ACETATO DE HIDROCORTISONA

6

7 Realizou-se a análise da matéria-prima acetato de hidrocortisona (AH)
8 segundo as especificações preconizadas pela USP XXVII e BP 2004. Foram
9 avaliadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor); solubilidade (água,
10 álcool etílico e clorofórmio).

11 A identificação por infravermelho foi realizada na faixa entre 500-4000 cm^{-1} .
12 Preparação do padrão: pesou-se 4,2 mg de AH padrão sigma e 298,4 mg de
13 brometo de potássio, foram trituradas em gral com pistilo por 10 minutos, para o
14 preparo da pastilha. Preparação da amostra: pesou-se 4,4 mg de AH matéria-prima
15 e 299,1 mg de brometo de potássio, foram trituradas em gral com pistilo por 10
16 minutos, para o preparo da pastilha. Perda por secagem até peso constante à 105⁰
17 C; ponto de fusão.

18 Doseamento do teor do acetato de hidrocortisona: pesou-se as massas
19 (0,0276 g; 0,0277 g; 0,0275 g) de AH, e procedeu-se a diluição de cada uma;
20 1/50x1/25 balão volumétrico, usando etanol como diluente. Realizou-se a leitura em
21 espectrofotômetro UV a 241,5 nm. Os cálculos foram realizados contra um padrão
22 de acetato de hidrocortisona da literatura ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$), valor tabelado de absorvidade
23 específica.

24 Cálculos:

$$\% = \frac{Aa \times 10 \times 50 \times 25 \times 100}{395 \times \text{pesada (mg)}}$$

4.3.2- PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM CICLODEXTRINAS

A formação dos complexos de inclusão do acetato de hidrocortisona em ciclodextrinas, (gama ciclodextrina e hidroxipropil beta-ciclodextrina), foi realizado através do método de diagrama de solubilidade de fase (HIGUCHI & CONNORS, 1965). O acetato de hidrocortisona foi adicionado em excesso a várias concentrações crescentes de soluções de ciclodextrina. As diferentes amostras foram submetidas à agitação e após ter sido alcançado o equilíbrio foram filtradas. A concentração do acetato de hidrocortisona foi determinada então por espectrofotometria no UV e avaliado o melhor percentual de inclusão entre as amostras utilizadas e posterior caracterização do complexo de inclusão.

4.3.2.1- PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM GAMA CICLODEXTRINA

Soluções de diferentes concentrações de gama ciclodextrina em água foram preparadas em frasco erlenmeyer de 125 mL com tampa e juntou-se o acetato de hidrocortisona na concentração fixa em torno de 5,0 mM. As amostras após preparadas foram deixadas, sob agitação, protegidas da luz com papel alumínio e em seguida foram filtradas através de papel de filtro; do filtrado foi retirada uma alíquota de 1,0 mL que foi adequadamente diluída em etanol e avolumada para 100,0 mL. Efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 241.5 nm.

1 Foram testados onze grupos de preparações distintas. Em cada grupo foram
2 variados os seguintes parâmetros: concentração de gama ciclodextrina, temperatura
3 e tempo de agitação das preparações, ordem de adição dos componentes, adição
4 de etanol para facilitar a solubilização do acetato de hidrocortisona. As amostras
5 foram mantidas sob e sem refrigeração, a fim de se determinar a condição ideal para
6 a preparação do complexo de inclusão. Todas as amostras continham uma
7 concentração final de 2 mg/mL de acetato de hidrocortisona. A concentração de
8 acetato de hidrocortisona das amostras para a leitura no espectrofotômetro foi de 20
9 µg/mL, as quantidades de ciclodextrinas nas amostras não interferiram na leitura
10 espectrofotométrica.

11 Grupos I e II: sem adição de etanol, alterando o tempo de agitação (figura 8).

12 Grupos III e IV: variando a quantidade de etanol (figura 9).

13 Grupos V e VI: variando a ordem de adição dos componentes do complexo de
14 inclusão (figura 10).

15 Grupos VII, VIII e IX: variando o tempo de agitação e a temperatura (figura 11).

16 Grupo X: amostras em temperatura ambiente, sem refrigeração (figura 12).

17 Grupo XI: parâmetros já pré-definidos só variando concentração de gama
18 ciclodextrina (figura 13).

19 Todos os testes foram realizados em duplicata.

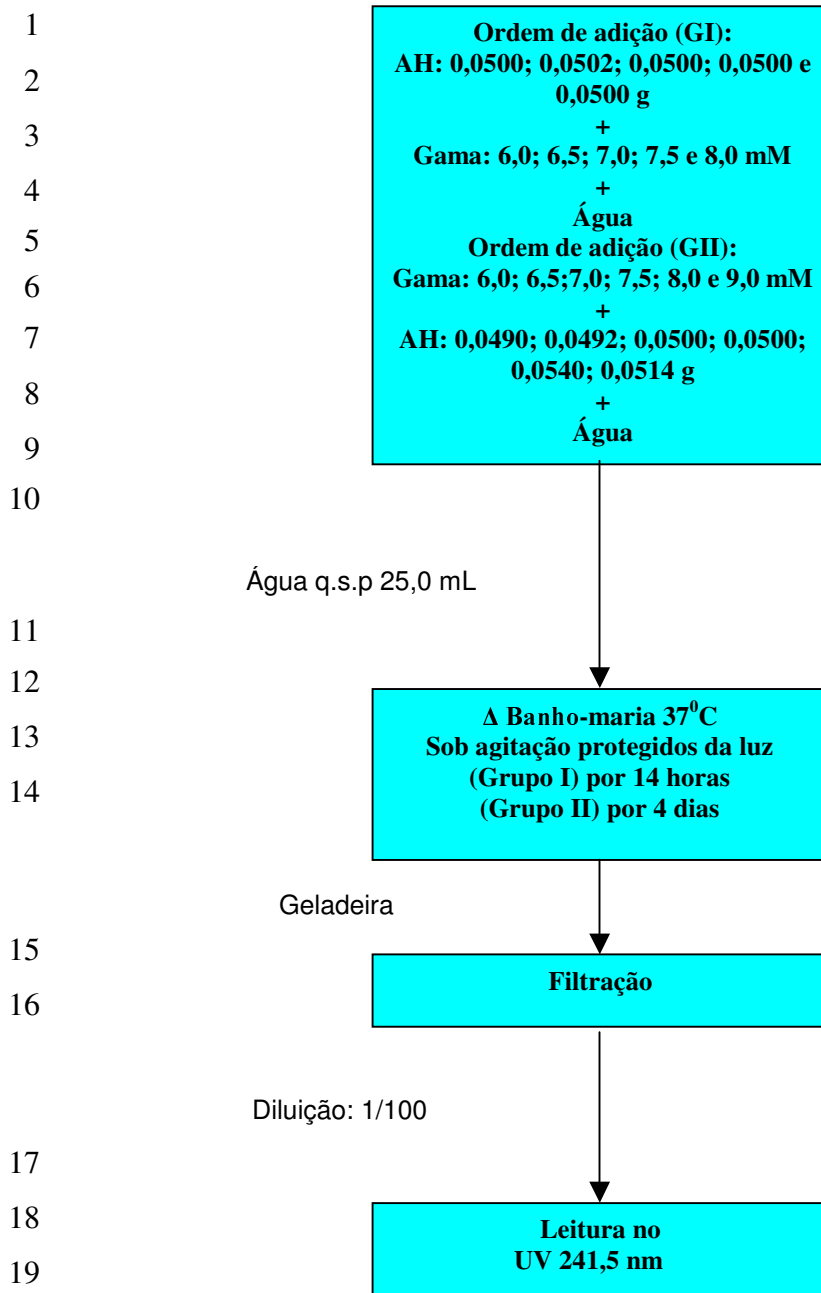
20

21

22

23

24



20 Figura 8: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os
21 grupos I e II.

22
23
24
25
26

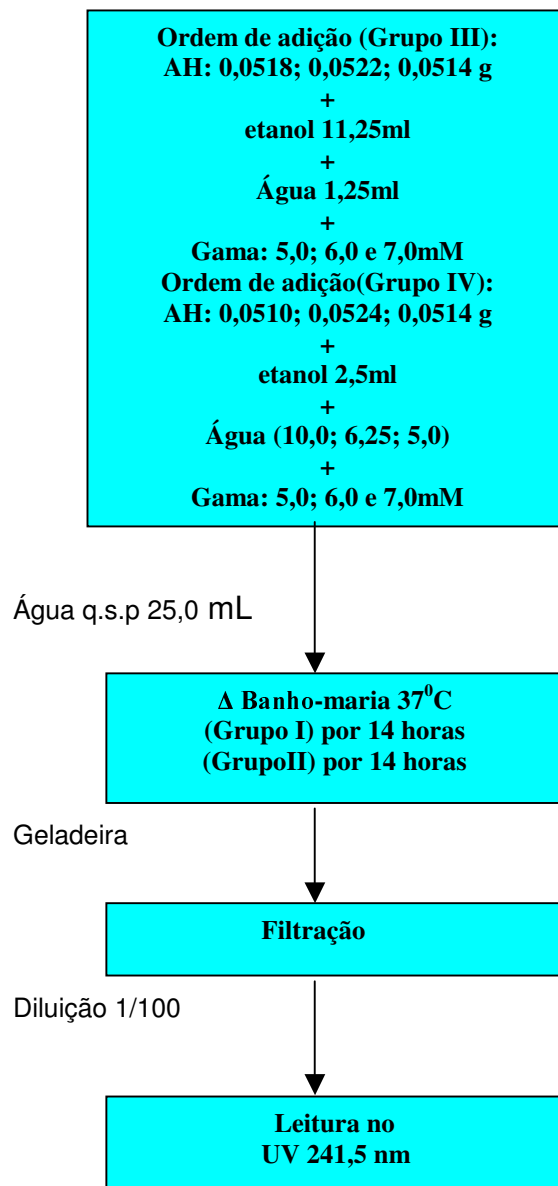
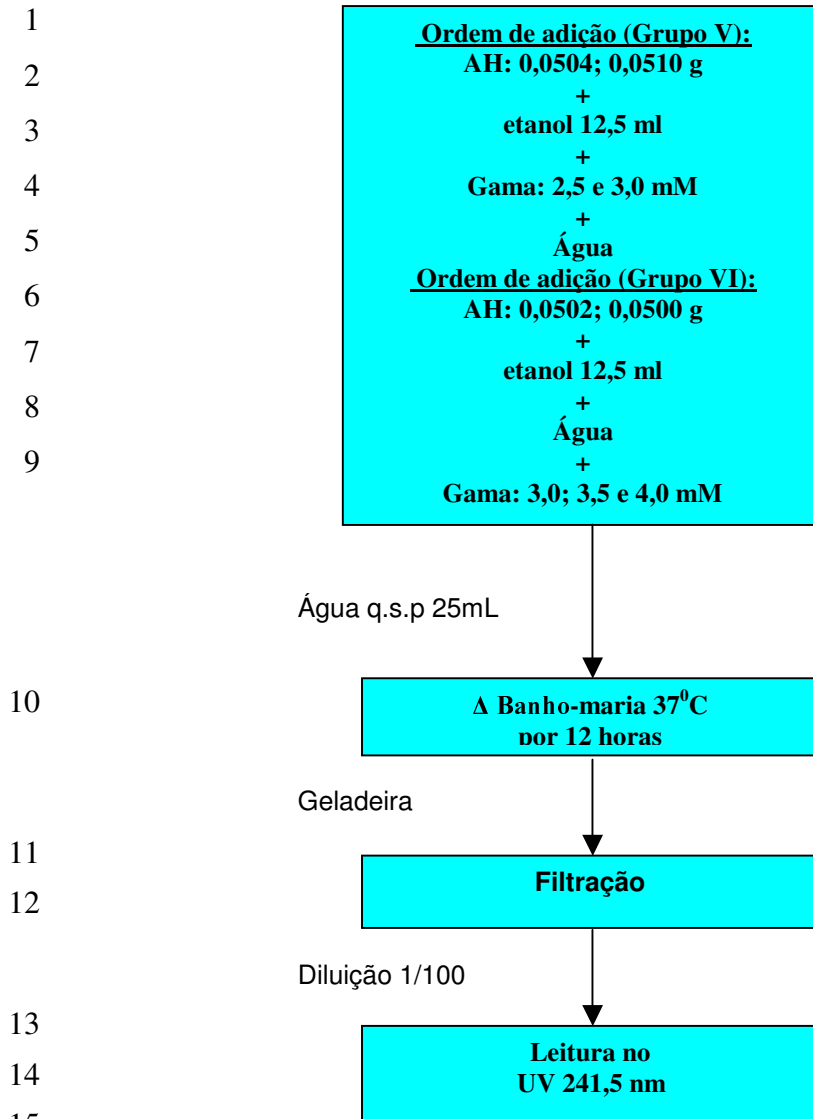


Figura 9: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos III e IV.



16 Figura 10: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para
17 os grupos V e VI.

18

19

20

21

22

23

24

25

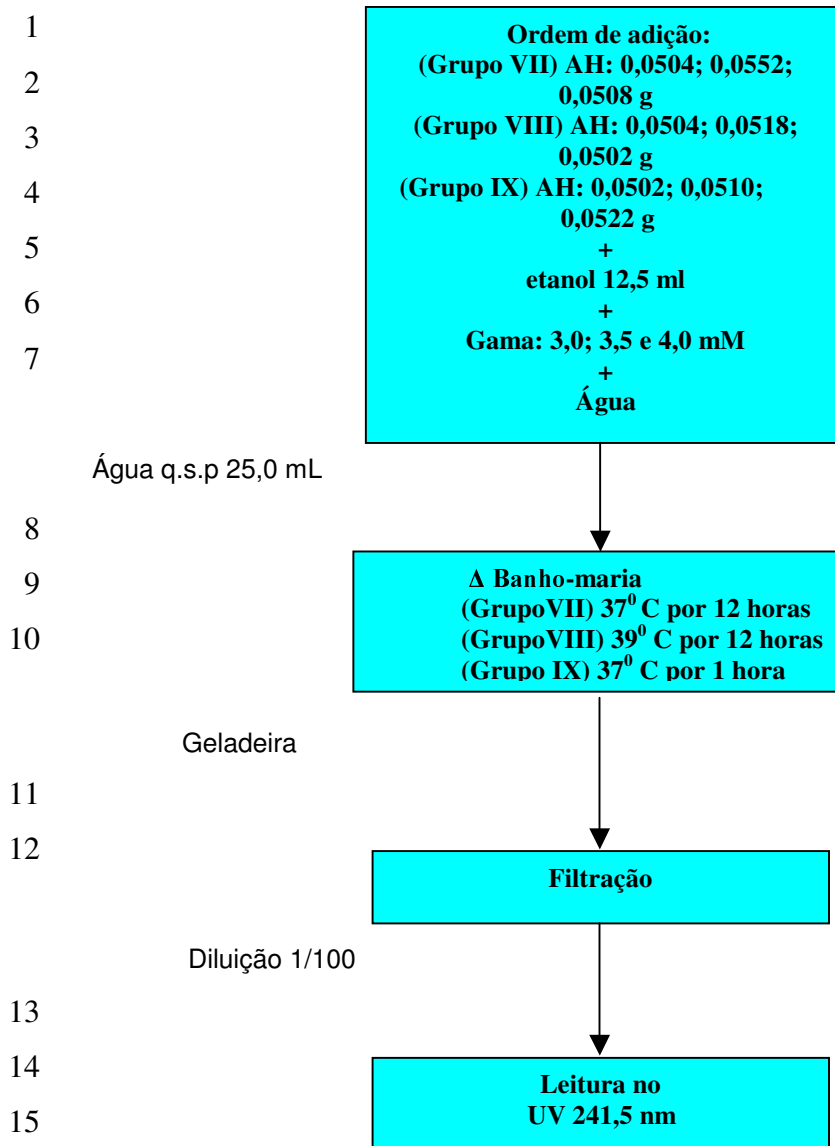
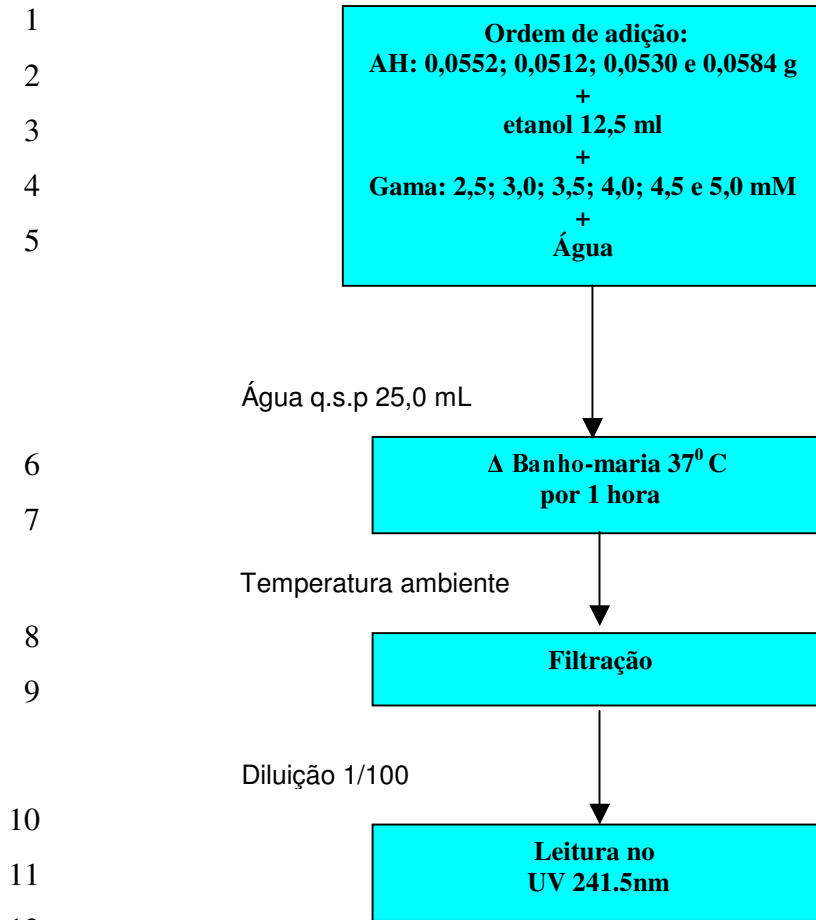


Figura 11: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para os grupos VII, VIII e IX.



13 Figura 12: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para o
14 grupo X.

15

16

17

18

19

20

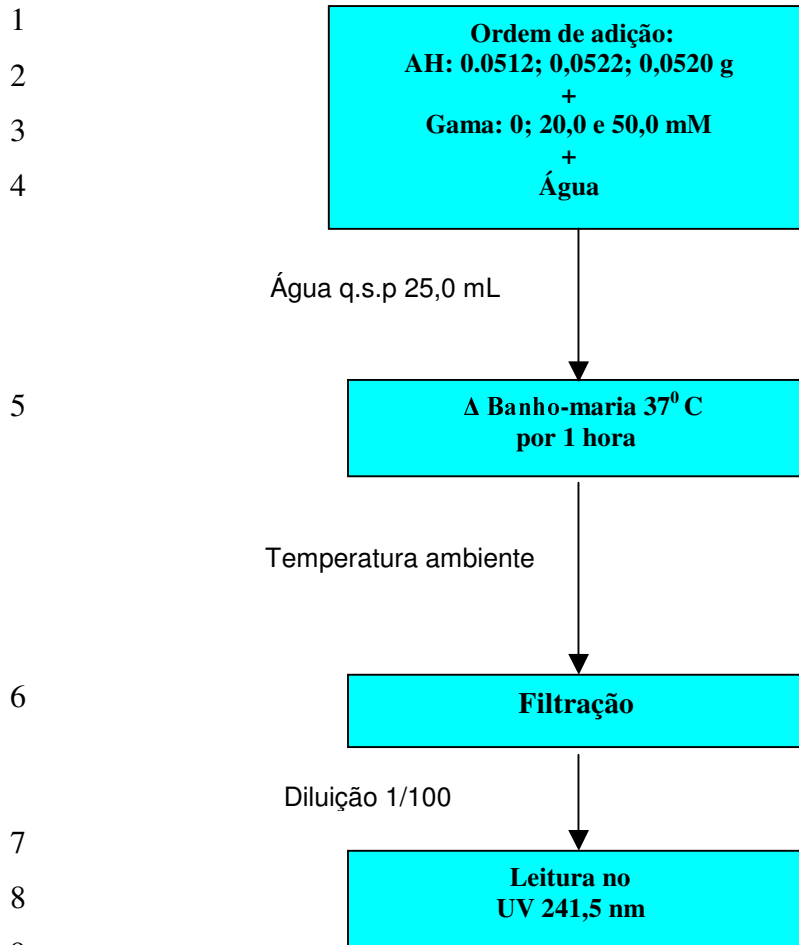
21

22

23

24

25



10 Figura 13: Preparação do complexo de inclusão do AH em gama ciclodextrina para o
11 grupo XI.

12]

13

14

15

16

17

18

19

20

1 **4.3.2.2- PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE** 2 **HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA UTILIZANDO** 3 **ÁGUA COMO VEÍCULO**

4
5 Foi realizado o teste da inclusão do acetato de hidrocortisona em hidroxipropil
6 β -ciclodextrina, por já ter sido relatado na literatura (GREIÉ *et al.*, 2000).

7 Pesou-se diferentes massas de acetato de hidrocortisona em frascos
8 erlenmeyer de 125 mL, a seguir acrescentou-se diferentes concentrações da solução
9 de hidroxipropil β -ciclodextrina (acetato de hidrocortisona na ausência e com
10 hidroxipropil β -ciclodextrina, 20, 50, 70, 75, 80, 85, 134, 135, 140 e 145 mM),
11 completou-se o volume de 25 mL com água.

12 As amostras foram colocadas em banho-maria, a 37°C, sob agitação em
13 frascos erlenmeyer de 125 mL com tampa, protegidas da luz com papel alumínio,
14 por 1 hora. Logo após as amostras foram filtradas através de papel de filtro, do
15 filtrado obtido foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para b.v. de 100,0 mL; completou-
16 se o volume com etanol e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 241,5 nm
17 (figura 14).

18

19

20

21

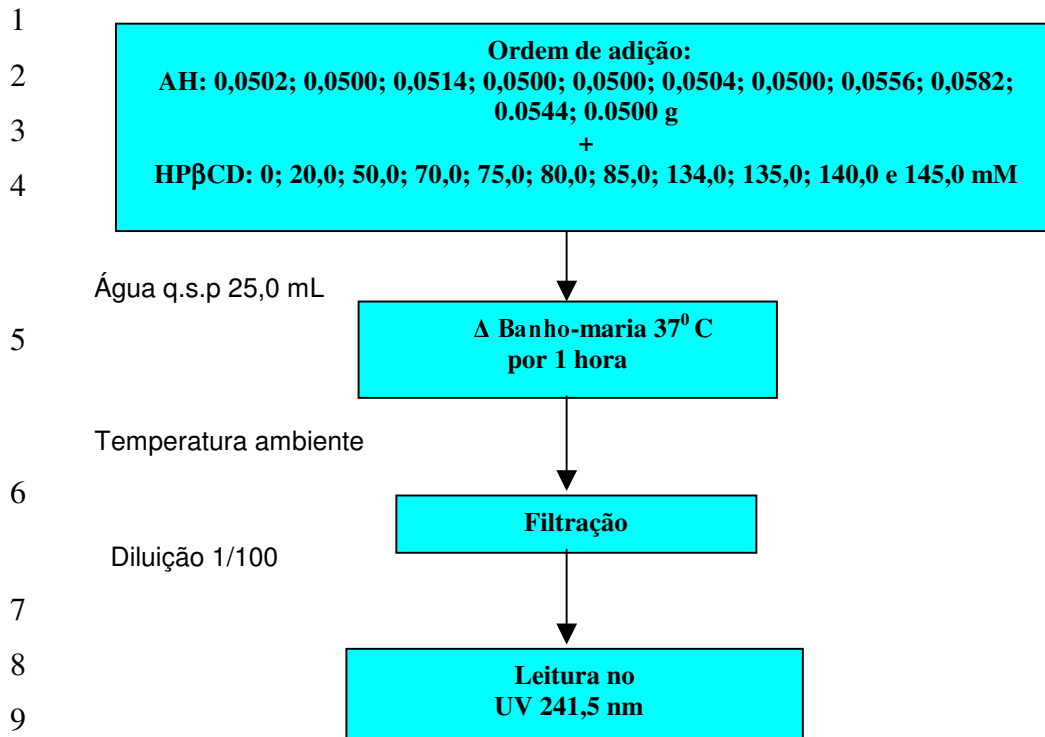
22

23

24

25

26



10 Figura 14: Preparação do complexo de inclusão do AH em HP β CD, veículo água.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

1 **4.3.2.3- PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO**
2 **ACETATO DE HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA,**
3 **UTILIZANDO COMO VEÍCULO TAMPÃO FOSFATO SALINO pH 7,4 (PBS) 0,1 M**

4
5 Foi verificada a influência da solução PBS 0,1 M pH 7,4 na formação do
6 complexo de inclusão, por constar na literatura a inclusão de hidrocortisona com
7 hidroxipropil β -ciclodextrina nesta solução (DAVIES, WANG & TUCKER, 1997).

8 Pesaram-se diferentes massas de acetato de hidrocortisona em frascos
9 erlenmeyer 125 mL, a seguir acrescentou-se diferentes concentrações de solução de
10 hidroxipropil β -ciclodextrina em PBS 0,1M pH 7,4 (acetato de hidrocortisona na
11 ausência de hidroxipropil β -ciclodextrina somente com 25,0 mL de PBS 0,1 M pH
12 7,4, e com 20, 50, 75, 134 mM de hidroxipropil beta-ciclodextrina), e por fim
13 completou-se com solução de PBS 0,1M pH 7,4.

14 As amostras recém preparadas foram deixadas em banho-maria, a 37°C, sob
15 agitação nos frascos erlenmeyer de 125 mL com tampa, protegidas da luz com papel
16 alumínio, por 1 hora. As amostras foram filtradas através de papel de filtro; do filtrado
17 obtido foi retirada uma alíquota de 1,0 mL que foi adequadamente diluída com etanol
18 e completou-se o volume para 100,0 mL. A leitura foi feita em espectrofotômetro a
19 241,5 nm (figura 15).

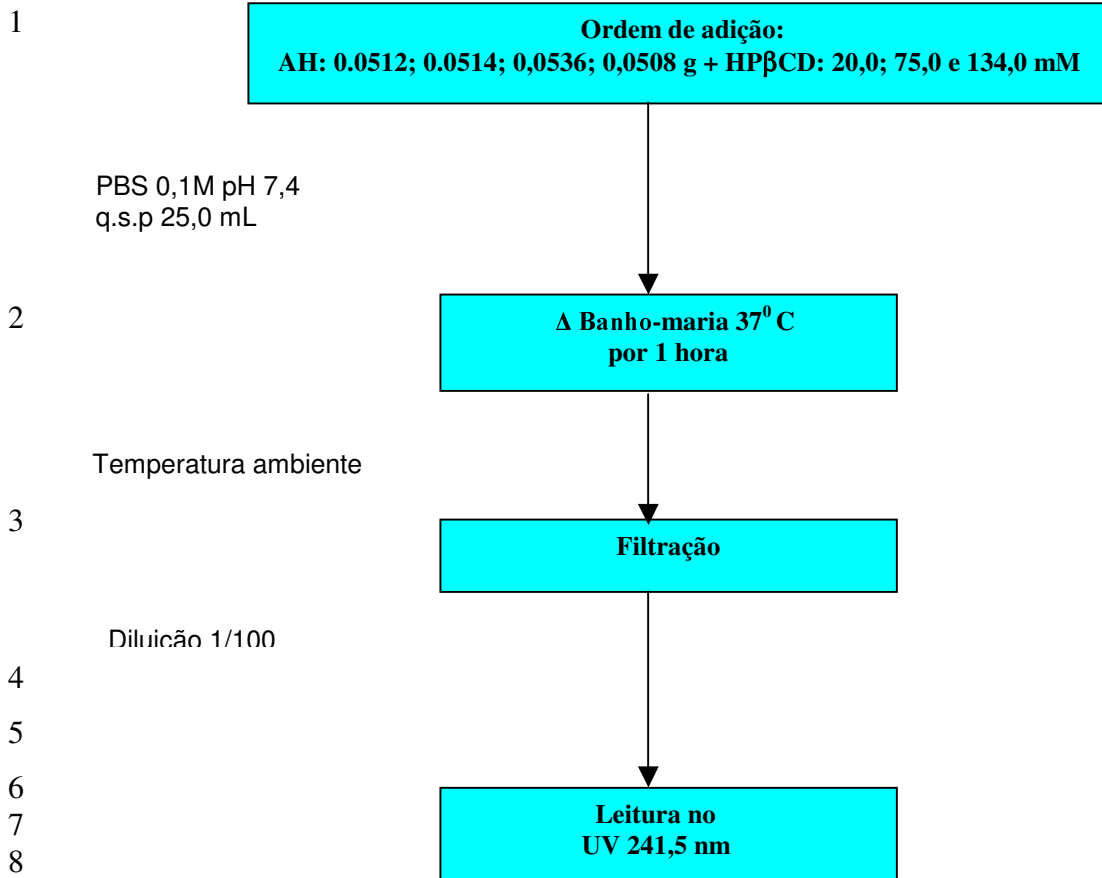
20

21

22

23

24



9 Figura 15: Preparação do complexo de inclusão do AH em HP β CD, veículo PBS pH
10 7.4 0,1 M.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

4.3.3- IDENTIFICAÇÃO DO PÓ RETIDO PELA FILTRAÇÃO DURANTE AS PREPARAÇÕES DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO AH EM CICLODEXTRINAS (GAMA CICLODEXTRINA E HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA)

Durante as preparações para a formação do complexo de inclusão em ciclodextrinas foi adicionado o AH e diferentes concentrações de soluções de ciclodextrinas (gama ciclodextrina e hidroxipropil β -ciclodextrina) foram deixadas sob agitação em temperaturas e tempos variados. Em seguida, as amostras foram filtradas, sendo neste filtrado analisado a concentração do AH. O pó retido no papel de filtro foi cuidadosamente seco em estufa, a 35°C, por 5 minutos e, posteriormente, retirado com auxílio de uma espátula de aço. Preparou-se a pastilha com brometo de potássio, cerca de 1,5 % do pó, para análise de identificação por IV de 500 a 4000 cm^{-1} .

4.3.4- PREPARAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA

Foi realizada a preparação do complexo de inclusão do acetato de hidrocortisona em hidroxipropil β -ciclodextrina, que obteve um melhor percentual de inclusão, em quantidade suficiente para a continuação do trabalho, visando o ensaio de uma formulação oral.

Adicionou-se uma massa de acetato de hidrocortisona de 0.813 g em 375,0 mL de solução aquosa de hidroxipropil β -ciclodextrina, à 134 mM, em frasco erlenmeyer de 500 mL com tampa. A amostra foi colocada em banho-maria, a 37°C

1 por 1 hora, sob agitação, protegida da luz com papel alumínio. Logo após o
2 resfriamento, à temperatura ambiente, a amostra foi transferida para frasco individual
3 cilíndrico apropriado para o liofilizador. A amostra foi previamente congelada em
4 freezer, inclinando-se o frasco de forma a ser obtida uma maior área superficial que
5 facilitasse o processo de liofilização.

6 O produto resultante foi homogeneizado em gral e avaliado quanto ao
7 percentual de inclusão pelo método de espectrofotometria. O rendimento do
8 complexo de inclusão obtido foi calculado.

9

10 **4.3.5- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE** 11 **HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA LIOFILIZADO**

12

13 **4.3.5.1- DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA**

14

15 Avaliou-se a estequiometria do complexo de inclusão através do tipo de
16 gráfico obtido pelo diagrama de solubilidade de fase segundo (HIGUCHI &
17 CONNORS 1965). De acordo com o gráfico obtido classifica-se o complexo formado
18 em; A (aumento na solubilidade) e B (queda da solubilidade). A obtenção de um
19 gráfico com o aumento da solubilidade com desvio positivo (A_p) indica uma
20 estequiometria 1:2, quando o aumento da solubilidade ocorrer linearmente, com o
21 aumento crescente da concentração de ciclodextrina (A_L), indica uma estequiometria
22 1:1 (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

23

24

4.3.5.2- DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ESTABILIDADE (K_s)

A determinação da constante de estabilidade (K_s) foi realizada segundo a equação abaixo, a fim de verificar a estabilidade do complexo formado (GRANT & HIGUCHI, 1990 apud DAVIES, WANG & TUCKER, 1997).

$$K_s = \frac{\text{Inclinação}}{S_0 (1-\text{Inclinação})}$$

Onde:

S₀= solubilidade do AH na ausência da hidroxipropil beta-ciclodextrina

Valores de K_s entre 200 e 5000 M⁻¹ são considerados ideais para a formação do complexo (BLANCO *et al.*, 1991).

4.3.5.3- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD LIOFILIZADO POR INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Foi realizado o espectro de IV para as 4 amostras: AH, HP β CD, mistura física (na mesma razão molar do complexo de inclusão AH/HP β CD 1:24) e complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado. A mistura física de AH/HP β CD foi obtida através da intensa trituração em gral com pistilo por 5 minutos, obtendo-se pastilhas com brometo de potássio. Os testes foram realizados em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu FTIR8300). Todas as amostras foram preparadas em quantidades descritas na tabela a seguir.

Tabela 6: Proporções dos componentes das amostras para obtenção de pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Amostras	Quantidades (mg)	KBr (mg)
AH	3,2	250
HP β CD	3,1	250
Mistura física	3,2	250
Complexo AH/HP β CD	3,2	250

As quantidades das amostras indicadas na tabela acima são equivalentes a cerca de 1,3% em relação a quantidade de brometo de potássio.

Para minimizar a interferência da água na banda dos espectros de IV as amostras foram mantidas em dessecador por 1 hora. Posteriormente, foram preparadas as pastilhas.

1 **4.3.5.4- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD** 2 **LIOFILIZADO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)**

3
4 As análises das características térmicas do AH, HP β CD, mistura física e
5 complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado foram determinadas por calorimetria
6 diferencial de varredura. Durante cada varredura, cerca de 1 a 2 mg das amostras
7 foram colocadas em pequenas painéis de alumínio, hermeticamente seladas, sob
8 atmosfera de nitrogênio. Todas as amostras foram aquecidas na faixa entre 0 –
9 320°C com velocidade de aquecimento de 10°C/minuto. Os termogramas foram
10 realizados em um calorímetro diferencial de varredura.

11 Segundo a literatura o desaparecimento de eventos termais da molécula
12 hóspede no interior do complexo de inclusão é geralmente a prova da inclusão
13 (SZEJTLI, 1982 & SENEL *et al.*, 1992 apud GINÉS *et al.*, 1998).

15 **4.3.5.5- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO POR** 16 **RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN-H¹)**

17
18 Foi realizado o RMN-H¹ do AH, HP β CD, mistura física e complexo de inclusão
19 AH/HP β CD liofilizado, a fim de verificar possíveis alterações em H-3 e H-5 presentes
20 na cavidade da HP β CD, pois são os sensores mais sensíveis na formação do
21 complexo de inclusão (FORGO, VINCZE & KOVER, 2003).

22
23
24
25

1 **4.3.5.6- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD**
2 **LIOFILIZADO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

3
4 As características do formato e da superfície do AH, HP β CD, mistura física e
5 do complexo de inclusão AH/HP β CD foram visualizados utilizando-se a microscopia
6 eletrônica de varredura. As amostras foram recobertas com uma fina camada de
7 ouro em um metalizador e distribuídas separadamente, sobre uma fita de carbono.
8 As fotomicrografias foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura
9 (MEV)-JEOL JSM 6460 LV, a uma voltagem de 15Kv.

10
11 **4.3.6- TESTE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO**
12 **AH/HP β CD LIOFILIZADO E DA MISTURA FÍSICA**

13
14 Foi verificada a solubilidade em água do complexo de inclusão AH/HP β CD
15 liofilizado e da mistura física, a fim de verificar o aumento da solubilidade do AH
16 incluso na HP β CD. A mistura física foi obtida pela trituração em gral com pistilo de
17 0,2 g de AH e 17,1438 g de HP β CD (mesma concentração do complexo de inclusão
18 liofilizado), por 5 minutos.

19 Os testes foram realizados conforme tabela de solubilidade da USP 27
20 (Description and Solubility). A solubilidade em água do complexo AH em HP β CD
21 liofilizado encontra-se na tabela 7 e a solubilidade da mistura física na tabela 8.

22

23

24

1 Tabela 7: Solubilidade do complexo AH/HP β CD liofilizado

Massa do complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado (g)	Massa correspondente de AH(g)	Volume adicionado de água (μ L)
0,8667	0,01	10
0,8662	0,01	100
0,8658	0,01	300
0,8665	0,01	1000
0,8666	0,01	10000

2

3 Tabela 8: Solubilidade da mistura física AH/HP β CD

Massa da mistura física AH/HP β CD(g)	Massa correspondente de AH(g)	Volume adicionado de água (μ L)
0,8673	0,01	10
0,8667	0,01	100
0,8668	0,01	300
0,8664	0,01	1000
0,8667	0,01	10000

4

5 Verificou-se para cada amostra a formação ou não de precipitado.

6

7 **4.3.7- DOSEAMENTO DO AH NO COMPLEXO DE INCLUSÃO**

8

9 O doseamento do AH no complexo de inclusão liofilizado foi realizado em
 10 triplicata, com uma concentração final em torno de 20 μ g/mL, usando etanol como
 11 solvente. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 241 nm. Os cálculos foram
 12 realizados contra um padrão da literatura (BP, 2004).

$$\% = \frac{Aa \times 10 \times 50 \times 25 \times 100}{395 \times \text{pesada (mg)}}$$

13

14

4.3.8- DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DO ACETATO DE HIDROCORTISONA INCLUSO EM HIDROXIPROPIL BETA-CICLODEXTRINA (SOLUÇÃO ORAL)

4.3.8.1- PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO

Foram preparadas três formulações de AH, seus componentes basearam-se na preparação de AH que vem sendo aviada pela Farmácia Universitária da UFRJ. Para aumentar a solubilidade do acetato de hidrocortisona em água foi utilizado o complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado.

As concentrações das soluções foram de 2 mg/mL de acetato de hidrocortisona, pois essa concentração vem sendo prescrita pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCFF) para o tratamento de crianças com hiperplasia adrenal congênita (HAC).

Foi preparado o xarope simples com quantidade de água destilada inferior a 100,0 mL, esta diferença foi utilizada para dissolver o complexo AH/HP β CD antes de sua incorporação no xarope simples, tabela 9.

1 Tabela 9: Preparação do xarope simples, utilizando diferentes concentrações de
 2 conservantes.

Componentes	Quantidade (g)		
Açúcar branco	84,9	84,8	84,9
Metilparabeno	0,1	0,2	-
Sorbato de potássio	-	-	0,1
Água destilada	60,0	60,0	60,0

3
 4 Preparação:

5 Em um bécher dissolveu-se o metilparabeno / sorbato de potássio, em água
 6 destilada, com aquecimento 65°C. Após solubilização adicionou-se o açúcar branco
 7 com agitação constante até a solubilização, após o resfriamento, à temperatura
 8 ambiente, filtrou-se a solução através de papel de filtro do tipo "chardin" obtendo-se
 9 o xarope simples.

10

11 Tabela 10: Preparação da formulação do AH/HP β CD no xarope simples com
 12 metilparabeno.

Componentes	Quantidade (g)
Xarope simples	41,10
Complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado	17,34
Água destilada	28,0

13

14 Tabela 11: Preparação da formulação de AH/HP β CD no xarope simples com sorbato
 15 de potássio.

Componentes	Quantidade (g)
Xarope simples	41,10
Complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado	17,34
Água destilada	28,0

16

1 Solubilizou-se o complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado em água
2 destilada, levando-se em banho de ultra-som por 5 minutos; a solução obtida foi
3 incorporada ao xarope simples, obtendo-se uma formulação límpida.

4 Foram desenvolvidas 3 formulações:

5 1^a - Complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado com xarope simples e conservante
6 metilparabeno na concentração de 0,1%.

7 2^a - Complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado com xarope simples e conservante
8 metilparabeno na concentração de 0,2%.

9 3^a - Complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado com xarope simples, e conservante
10 sorbato de potássio na concentração de 0,1%.

11 O pH das formulações ficaram em torno de 5,0, pois é o valor de pH em que
12 os conservantes se mantêm estáveis e com boa atividade (HANDBOOK OF
13 PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 1994). O pH foi determinado através de um
14 potenciômetro com eletrodo indicador de vidro e de referência de prata cloreto de
15 prata.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

4.3.9- DESENVOLVIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES COM AH EM HP β CD

Foram empregadas várias condições cromatográficas para a análise da substância ativa (AH) e dos possíveis produtos de degradação formados em solução, sob estresse, (40°C por 1 dia) e da preparação de complexo de inclusão AH em HP β CD na formulação, a fim de avaliar também, a separação do conservante na formulação.

Foi pesado cerca de 0,02 g de AH em 10,0 mL de etanol, essa solução foi colocada em estufa, a 40°C, por 1 dia. A amostra foi diluída em uma mistura de metanol/água (50:50), obtendo uma concentração final em torno de 200 μ g/mL.

O complexo de inclusão formado do AH em HP β CD 134 mM foi pesado e diluído em uma mistura de metanol/água (50:50), obtendo uma concentração final em torno de 400 μ g/mL.

As condições cromatográficas iniciais foram baseadas no trabalho de Hájková e colaboradores (HÁJKOVÁ *et al.*, 2003).

Utilizou-se uma pré-coluna com 1 cm x 4 mm de octadecil silano (ODS) e diâmetro de poro de 5 μ m, uma coluna 15 cm x 4.6 mm ODS e diâmetro de poro 5 μ m, detector UV de arranjo de fotodiodos.

As concentrações das amostras foram em torno de 400 μ g/mL, tendo sido variados alguns parâmetros a fim de verificar o cromatograma com menor tempo de retenção e melhor resolução (R). Os parâmetros variados para a validação do método foram: comprimento de onda de detecção, fluxo, composição da fase móvel e temperatura da pré-coluna e coluna, validando-se o método posteriormente.

1 Tabela 12: Condições cromatográficas testadas para a matéria-prima AH sob
 2 estresse

Condições cromatográficas	Fase móvel MeOH/AcCN/H ₂ O v/v/v	Fluxo (mL/minuto)	Temperatura da pré-coluna e coluna (°C)	Detector λ nm
1	50/35/15	1.0	25	242
2	50/35/15	1.0	25	238
3	15/45/40	1.0	25	238
4	20/40/40	1.0	25	238
5	25/35/40	1.0	25	238

3

4 Tabela 13: Condições cromatográficas testadas para o complexo de inclusão AH em
 5 HPβCD na formulação.

Condições cromatográficas	Fase móvel MeOH/AcCN/H ₂ O v/v/v	Fluxo (mL/minuto)	Temperatura da pré-coluna e coluna (°C)	Detector λ nm
6	28/32/40	1.0	25	238
7	35/25/40	1.0	25	238
8	35/25/40	1.0	30	238
9	35/25/40	1.0	35	238

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

1 **4.3.10- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A FORMULAÇÃO** 2 **DE AH**

3
4 A validação estabelece evidências documentadas de um sistema,
5 comparando o que consistentemente se produz com o que se propõe a produzir
6 (BRASIL, 2003).

7 Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação de metodologia
8 analítica: linearidade, precisão, exatidão e a interferência dos excipientes da
9 formulação, pois o método enquadra-se na categoria I da classificação das normas
10 da ANVISA (BRASIL, 2003).

11 12 **4.3.10.1- LINEARIDADE**

13
14 Foram preparadas duplicatas de soluções de AH, a partir de uma solução
15 mãe, padrão sigma, nas concentrações de 240, 270, 300, 330 e 360 µg/mL, para a
16 obtenção da curva padrão, sendo cada solução injetada duas vezes no
17 cromatógrafo. Com esses dados construiu-se uma curva de calibração com as
18 concentrações do AH versus a resposta gerada no ensaio da área. Determinou-se a
19 equação da reta ($y = ax + b$) calculando-se o intercepto (b), a inclinação (a) e o
20 coeficiente de correlação(r), obtidos das réplicas analisadas. Este procedimento foi
21 realizado em triplicata.

22

23

24

4.3.10.2- PRECISÃO

Para avaliar a precisão foi realizada a análise do teor das formulações desenvolvidas. A preparação das soluções amostras foi realizada conforme o esquema abaixo:

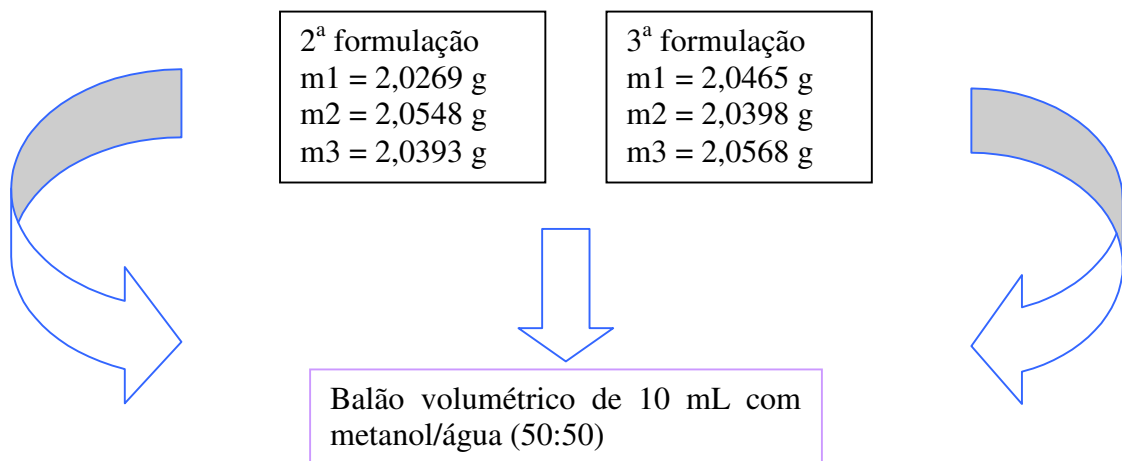


Figura 16: Preparação da solução amostra para análise de precisão do método

Cada solução amostra foi preparada em triplicata e injetada duas vezes no cromatógrafo. A quantificação foi feita em cada injeção e o desvio padrão relativo foi calculado com seis resultados.

Um DPR menor que 2% é considerado bom (HASWELL, 1992). DPR acima de 5% o método analítico não é considerado preciso (BRASIL, 2003).

Cálculo do DPR:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde:

DPR= desvio padrão relativo

DP= desvio padrão

CMD= concentração média determinada

4.3.10.3- EXATIDÃO

Defini-se por exatidão a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro. É normalmente expressa como o desvio percentual das concentrações calculadas em relação às concentrações reais (KARTAL, 2001).

A exatidão é calculada como taxa de recuperação; adicionando-se quantidades conhecidas do composto de referência em cada formulação, em ordem crescente, para obter três concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

Os testes de recuperação foram realizados da seguinte forma: foram preparadas formulações com concentrações de AH 80, 100 e 120% da concentração declarada.

Cálculo da exatidão:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

4.3.10.4- INTERFERÊNCIA DOS EXCIPIENTES DA FORMULAÇÃO

Foram preparadas soluções contendo apenas os excipientes, nas mesmas concentrações que as formulações com a substância ativa, a fim de verificar a interferência dos excipientes na metodologia analítica.

1 **4.3.11- ANÁLISE QUANTITATIVA DO ACETATO DE HIDROCORTISONA NAS** 2 **FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS**

3

4 A metodologia de análise para a determinação do teor e dos produtos de
5 degradação do AH das três formulações desenvolvidas foi realizada através de
6 CLAE de fase reversa, com detector de UV e arranjo de fotodiodo, de método
7 previamente validado.

8 Analisou-se as matérias-primas AH e HP β CD separadamente que foram
9 empregadas para a formação do complexo de inclusão AH/HP β CD e dos outros
10 componentes das formulações.

11 A quantificação do acetato de hidrocortisona na formulação foi baseada na
12 determinação da curva padrão.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 **4.3.12- ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO** 2 **DO AH EM HP β CD**

3

4 A partir dos dados obtidos da avaliação do complexo de inclusão do
5 AH/HP β CD com melhor percentual de inclusão, construímos um modelo hipotético
6 de uma das possibilidades de estruturas do complexo de inclusão por modelagem
7 molecular.

8 O grau de substituição da HP β CD pode variar de 4,0–8,0. Este índice indica o
9 número médio de grupos hidroxipropila (HP) por unidade de β -ciclodextrina.
10 Portanto, na construção da molécula de HP β CD consideramos, por questões de
11 simetria, um grupo HP ligado ao álcool primário de cada unidade de glicose, o que
12 corresponde a um grau de substituição de 7,0.

13 O complexo de inclusão do acetato de hidrocortisona (AH) com a 2-
14 hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD) foi obtido por encaixe manual das estruturas
15 isoladas e previamente minimizadas e submetido a minimização de energia usando
16 o campo de força MM+ do programa HyperChem (versão 7.5 para Windows,
17 Hypercube, Inc.).

18

19

20

21

22

23

24

1 4.3.13- ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO COMPLEXO DE INCLUSÃO 2 DO AH EM HP β CD LIOFILIZADO

3

4 A difração de raios-X (DRX) pelo método do pó utiliza um único comprimento
5 de onda oriundo de uma fonte (tubo catódico) constituído por metais leves (Cu, Mo,
6 Cr, Co, Fe, Ni), cujo catodo é bombardeado por elétrons de energia da ordem de 25
7 a 50KV. Os raios-X gerados variam numa faixa de 0,7 a 2,3Å, sendo facilmente
8 absorvidos. O espalhamento e a conseqüente difração de raios-X que ocorre devido
9 às nuvens eletrônicas dos átomos presentes nas amostras permite identificar as
10 linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais
11 cristalinos. Se os átomos estiverem arranjados regularmente no espaço de rede, o
12 ângulo de espalhamento 2θ está diretamente relacionado à distância interplanar.

13 As amostras do AH, HP β CD, mistura física e complexo de inclusão
14 AH/HP β CD, foram colocadas sobre tiras com dimensões 2 x 2 cm², e varridas com
15 ângulo de incidência dos raios-X (2θ) na faixa de 0 a 60°. Através do espectro pode-
16 se identificar as fases cristalinas, por meio da medida da distância entre os planos
17 cristalinos, característicos de cada material, através da medida de posição dos picos
18 obtidos nos espectros das amostras.

19 As análises de DRX nas amostras foram feitas nas seguintes condições
20 operacionais: radiação 30 KV / CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), ângulo de varredura (2θ): 2 a
21 60°, velocidade angular: 0,05°.

22 Os efeitos do tipo, da concentração e da granulometria do sal foram avaliados
23 por esta técnica.

1 **V- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2

3 **5.1- ACETATO DE HIDROCORTISONA**

4

5 **5.1.1- ASPECTO, COR E ODOR**

6

7 Apresentou-se em forma de pó branco e inodoro, de acordo com a
8 especificação da Farmacopéia Britânica (BP 2004).

9

10 **5.1.2- IDENTIFICAÇÃO**

11

12 Foi realizada a identificação por IV, utilizando-se o padrão sigma como
13 referência (figura 17), avaliando-se a matéria-prima (AH) (figura 18).

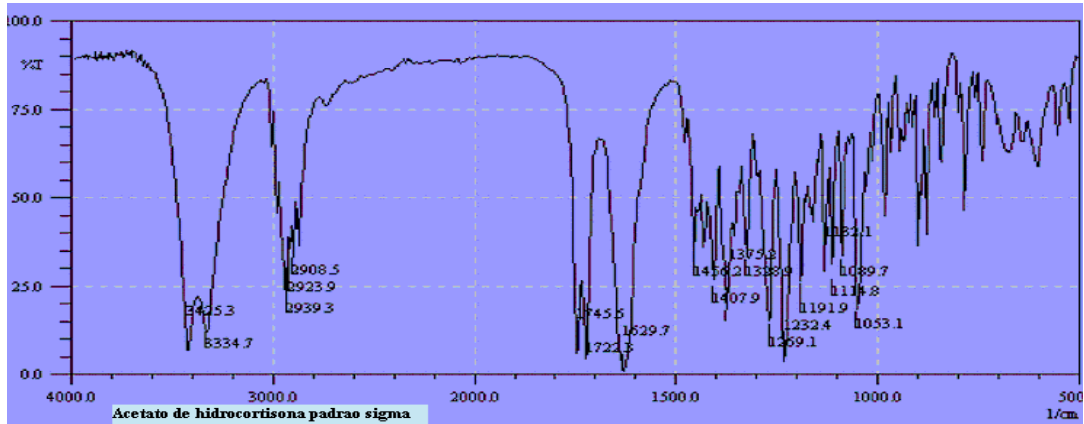
14

15

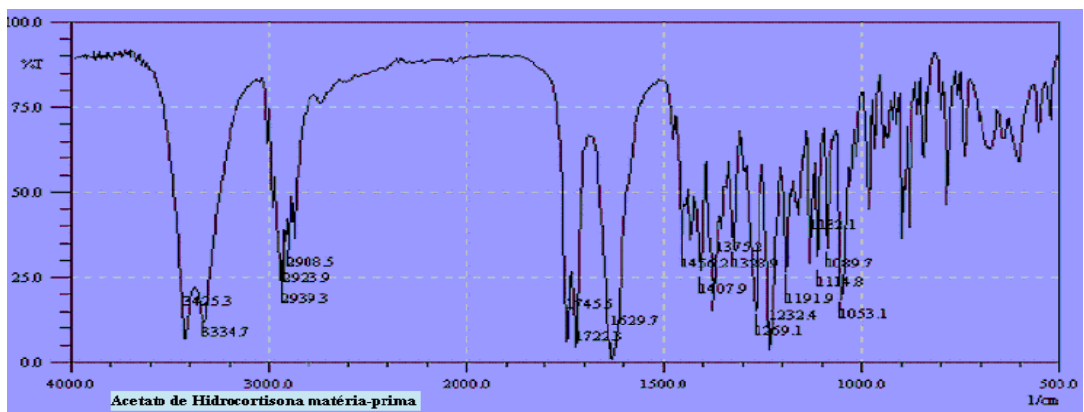
16

17

18



1 Figura 17: Espectros de IV do acetato de hidrocortisona padrão sigma.



2 Figura 18: Espectro de IV do acetato de hidrocortisona matéria-prima.

3

4 5.1.3- SOLUBILIDADE

5

6 Foi realizada a solubilidade do AH: sendo insolúvel em água, levemente
7 solúvel em etanol e clorofórmio estando de acordo com a especificação da
8 farmacopéia americana (USP 27, 2004).

9

10 5.1.4- PERDA POR SECAGEM

11

12 Após avaliação da secagem em estufa até peso constante a amostra perdeu
13 0,38%, encontrando-se de acordo com a especificação da farmacopéia britânica que
14 preconiza uma perda de não mais que 0,5% de seu peso (BP, 2004).

5.1.5- PONTO DE FUSÃO

Foi determinado o ponto de fusão entre 213.4 e 218.4 °C através da média de três determinações. Os resultados estão de acordo com a especificação da farmacopéia britânica, que preconiza temperatura de 220 °C com decomposição (BP, 2004).

5.1.6- TEOR

Foi determinado o teor de $101,9 \pm 0.74\%$ na matéria-prima, estando aprovado Segundo a especificação da Farmacopéia Britânica, onde deve conter não menos que 97,0% e não mais que 103,0% calculada sob a base anidra (BP, 2004).

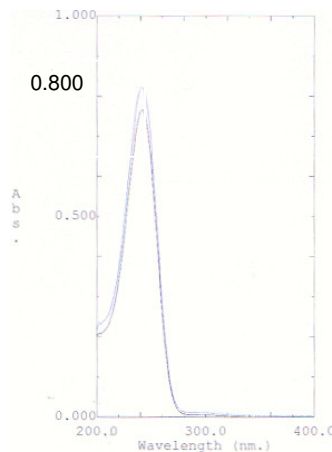


Figura 19: Espectros de UV do acetato de hidrocortisona matéria-prima

5.2- AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM CICLODEXTRINAS

5.2.1- AVALIAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM GAMA CICLODEXTRINA

Os percentuais de inclusão do AH em gama ciclodextrina, calculados pelo método espectrofotométrico para o grupo I (tabela 14) e para o grupo II (tabela 15), encontram-se a seguir:

Tabela 14: Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina - grupo I

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
6,0	4,94	23,5 ± 0,85
6,5	4,96	33,9 ± 0,78
7,0	4,94	25,0 ± 0,92
7,5	4,94	27,0 ± 1,25
8,0	4,94	29,5 ± 1,08

Tabela 15: Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina - grupo II

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
6,0	4,85	19,4 ± 0,64
6,5	4,86	18,8 ± 0,95
7,0	4,94	19,9 ± 1,31
7,5	4,94	19,9 ± 1,06
8,0	5,34	21,3 ± 0,88
9,0	5,08	19,9 ± 0,92

Comparando-se os resultados obtidos entre os grupos I e II, verificou-se que com tempo de agitação de 14 horas, grupo I, obteve-se melhores percentuais de inclusão do que aqueles obtidos com tempo de agitação de 4 dias (grupo II).

Os percentuais de inclusão do AH em gama ciclodextrina, calculados pelo método espectrofotométrico para o grupo III e para o grupo IV estão representados nas tabelas 16 e 17 a seguir:

Tabela 16: Percentual de inclusão do AH em gama ciclodextrina – grupo III

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
5,0	5,12	23,5 ± 0,62
6,0	5,16	33,9 ± 0,81
7,0	5,01	25,0 ± 0,93

Tabela 17: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo IV

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
5,0	5,04	15,2 ± 0,99
6,0	5,18	17,1 ± 1,19
7,0	5,08	18,1 ± 0,74

Comparando-se os resultados obtidos entre os grupos III e IV, verificou-se que com uma maior quantidade de etanol (grupo III), obteve-se melhores percentuais de inclusão do que aqueles obtidos com quantidade de etanol inferior (grupo IV).

Os percentuais de inclusão do AH em gama ciclodextrina, calculados pelo método espectrofotométrico para o grupo V (tabela 18) e para o grupo VI (tabela 19).

1 Tabela 18: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo V

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
2,5	4,98	59,4 ± 1,07
3,0	5,04	65,8 ± 1,14

2

3 Tabela 19: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo VI

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
2,5	4,96	41,3 ± 0,89
3,0	4,94	44,5 ± 1,06

4

5 Comparando-se os resultados obtidos entre os grupos V e VI, verificou-se que
6 a ordem de adição AH+etanol+gama+água (grupo V) obteve-se melhores
7 percentuais de inclusão do que aqueles obtidos com a ordem de adição
8 AH+etanol+água+gama (grupo VI).

9

10 Os percentuais de inclusão do AH em gama ciclodextrina, calculados pelo
11 método espectrofotométrico para o grupo VII (tabela 20), grupo VIII (tabela21) e para
12 o grupo IX (tabela 22), estão descritos nas respectivas tabelas a seguir.

13

14 Tabela 20: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo VII

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
3,0	4,98	68,4 ± 0,86
3,5	5,46	69,9 ± 0,73
4,0	5,02	71,3 ± 1,02

15

1 Tabela 21: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo VIII

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
3,0	4,98	44,2 ± 0,95
3,5	5,12	46,6 ± 0,94
4,0	4,96	49,4 ± 1,26

2

3 Tabela 22: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo IX

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
3,0	4,96	101,4 ± 1,16
3,5	5,12	104,3 ± 0,74
4,0	4,96	105,0 ± 0,68

4

5 Comparando os resultados obtidos entre os grupos VII e VIII, verificou-se que
6 a preparação realizada a 37°C por 12 horas (grupo VII) apresentou percentuais de
7 inclusão melhores do que aqueles obtidos com a preparação a 39°C por 12 horas
8 (grupo VIII).

9 Comparando os resultados entre os grupos VII e IX, verificou-se que a
10 preparação que foi agitada por 1 hora (grupo IX) apresentou percentuais de inclusão
11 melhores do que as amostras agitadas por 12 horas (grupo VII).

12 Tabela 23: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo X

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 2
2,5	5,46	99,5 ± 0,95
3,0	5,06	101,4 ± 0,82
3,5	5,24	104,3 ± 0,89
4,0	5,76	105,0 ± 1,01

13

14

1 Os resultados de inclusão do AH em gama ciclodextrina apresentados na
2 tabela 23 confirmaram os resultados descritos na tabela 22, (grupo IX), onde a
3 ordem de adição foi: AH + solução de gama + água, preparados com agitação
4 durante 1 hora, a uma temperatura de 37°C.

5 Tabela 24: Percentual de inclusão do AH em Gama ciclodextrina – grupo XI

Concentração da solução de gama ciclodextrina (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 3
0	5,06	0,38 ± 0,97
20	5,16	29,6 ± 0,76
50	5,14	26,9 ± 0,84

6
7 Verificou-se através dos resultados obtidos acima que um aumento da
8 concentração de gama ciclodextrina diminuiu o percentual de inclusão do AH.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

5.2.2- AVALIAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL BETA-CICLODEXTRINA

Foram preparados complexos de inclusão do acetato de hidrocortisona em HP β CD segundo metodologia descrita por GREIÉ e colaboradores (2000), sendo que o solvente etanol foi substituído ora por água (tabela 25), ora por PBS 0,1M pH 7,4 (tabela 26), para a preparação do complexo de inclusão descrita por DAVIES e colaboradores (1997).

Tabela 25: Percentual de inclusão do AH em HP β CD – veículo água.

Concentração da solução de HP β CD (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 3
0	4,96	0,46 \pm 0,99
20	4,94	18,2 \pm 0,82
50	5,08	41,7 \pm 0,96
70	4,94	52,3 \pm 1,03
75	4,94	56,9 \pm 1,54
80	4,98	59,2 \pm 1,32
85	4,94	65,2 \pm 0,64
134	5,50	91,5 \pm 0,98
135	5,75	91,5 \pm 0,92
140	5,38	89,5 \pm 0,87
145	4,94	72,5 \pm 1,09

Tabela 26: Percentual de inclusão do AH em HP β CD - veículo PBS 0,1M pH 7,4.

Concentração da solução de HP β CD (mM)	Concentração de AH (mM)	Inclusão (%) n = 3
0	5,05	0,52 \pm 1,08
50	5,07	27,4 \pm 1,45
75	5,29	40,6 \pm 1,60
134	5,01	70,0 \pm 0,96

1 Através dos resultados obtidos da tabela 25, verificou-se que o aumento da
2 concentração de HP β CD houve um aumento do percentual de inclusão do AH,
3 atingindo um limite máximo de 134 mM, com um bom percentual de inclusão 91,5%.
4 Entretanto, para concentrações maiores que 134 mM, detectou-se um decréscimo
5 do percentual de inclusão do AH.

6 O percentual de inclusão (tabela 25), foi maior que o encontrado pelo trabalho
7 de GREIÉ e colaboradores, 2000, que foi de 25% a inclusão, utilizando a técnica de
8 secagem com pulverização.

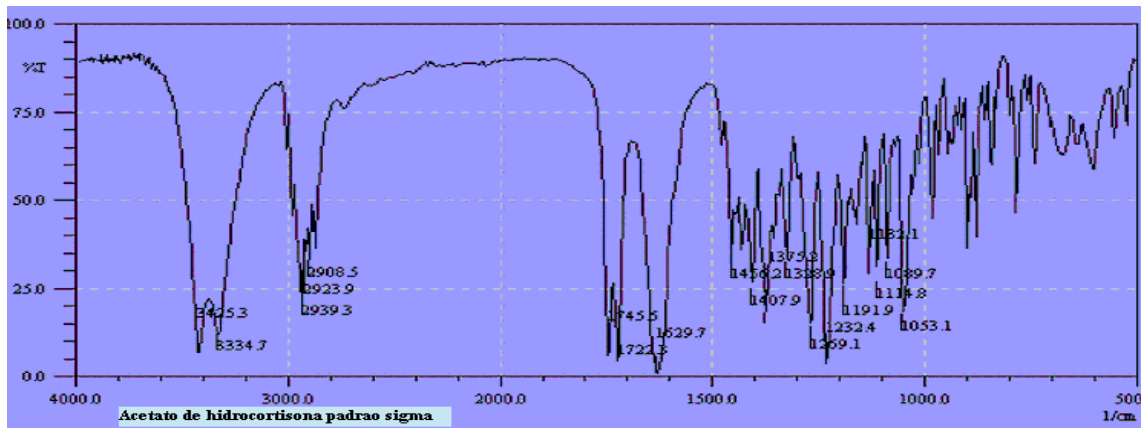
9 Verificamos que o percentual de inclusão do AH em HP β CD, usando água
10 como solvente, foi cerca de 34,3%, 28,6% e 23,5% maior, para as concentrações de
11 50, 75 e 134 mM, quando comparado ao percentual de inclusão que usou PBS como
12 solvente (tabelas 25 e 26).

13 A comparação dos percentuais de inclusão do AH em gama e HP β CD,
14 utilizando água como solvente, também foram diferentes entre si (tabelas 24 e 25),
15 tendo sido obtidos melhores resultados ao usar a HP β CD na concentração de 50
16 mM e menor na concentração de 20 mM.

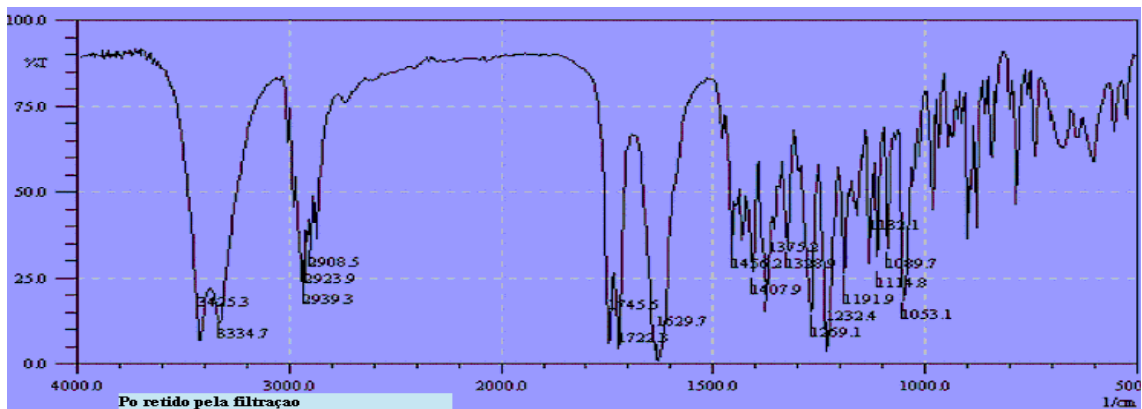
17 A melhor condição encontrada para a inclusão do AH em ciclodextrina foi
18 utilizando a HP β CD na concentração de 134 mM, preparada à 37°C com um tempo
19 de agitação de 1 hora.

1 **5.3- AVALIAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DO PÓ RETIDO PELA FILTRAÇÃO**
 2 **DURANTE AS PREPARAÇÕES DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO**
 3 **DE HIDROCORTISONA EM CICLODEXTRINAS (GAMA CICLODEXTRINA E**
 4 **HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA)**

5
 6 O pó retido pela filtração de todas as preparações do complexo de inclusão
 7 do AH em gama ciclodextrina e HP β CD possuíram o mesmo espectro de IV,
 8 conforme exibido nas figuras abaixo.



9 Figura 20: Espectro de IV do AH padrão sigma.



10 Figura 21: Espectro de IV do pó retido pela filtração durante a preparação do
 11 complexo de inclusão do AH em ciclodextrinas.

1 O espectro de IV do pó das preparações dos complexos de inclusão do AH
2 em ciclodextrinas demonstrou possuir todas as bandas características do padrão de
3 AH. As bandas principais são possivelmente; 1745, 1723 cm^{-1} deformações axiais
4 (C=O) de acetato; 3425 e 3334 cm^{-1} deformação axial de O–H, 1640, 1610 cm^{-1} de
5 carbonila de aromático; 1232, 1115 e 1042 cm^{-1} deformações axiais de C–O de éster
6 (SILVERSTEIN, BASSLER & MORRIL, 1994).

7

8 **5.4- OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO** 9 **DE HIDROCORTISONA EM HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA**

10

11 Foi realizada a análise do complexo de inclusão AH em HP β CD após sua
12 liofilização.

13 O liofilizado apresentou-se como um pó amorfo branco, com rendimento de
14 77,41%.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

5.4.1- TEOR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH EM HP β CD

Foi determinado o teor de 96,8% \pm 0,86% de AH no complexo de inclusão.

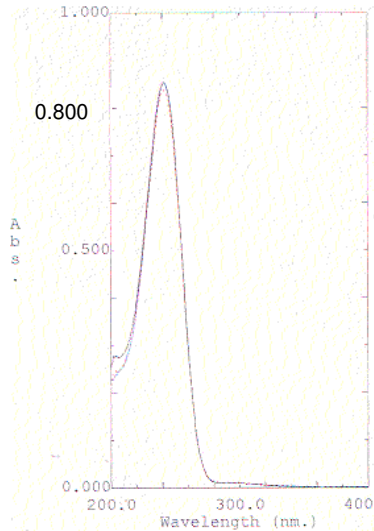


Figura 22: Espectros de UV do complexo liofilizado.

Foi possível verificar através do espectro de UV da HP β CD pura que não houve interferência desta na análise do complexo de inclusão do AH em HP β CD.

5.5- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO AH EM HP β CD

5.5.1- DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA

A estequiometria do complexo de inclusão do AH em HP β CD foi determinada em função do tipo de curva obtido no diagrama de solubilidade de fases do complexo conforme apresentado na figura 23.

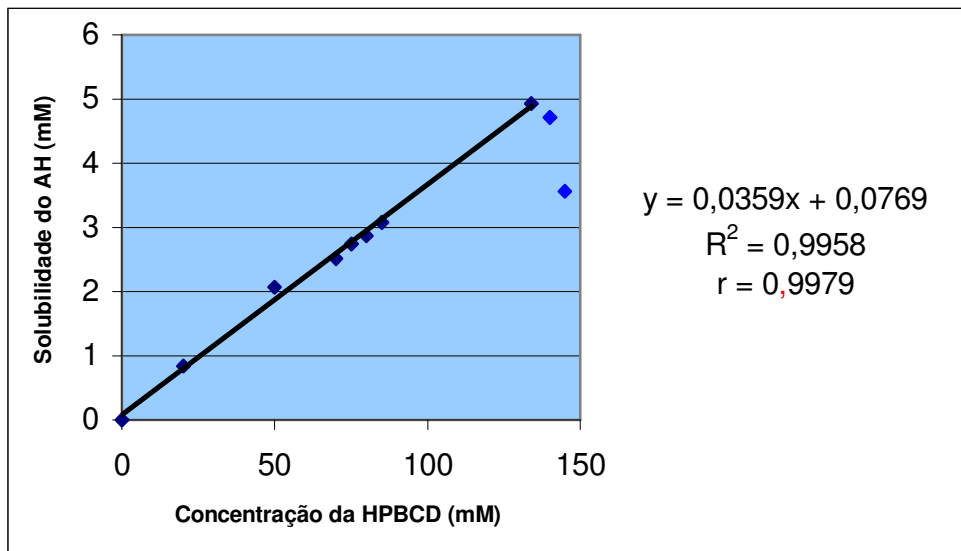


Figura 23: Diagrama de solubilidade de fases do AH em função da concentração da HP β CD no complexo de inclusão AH/HP β CD em solução aquosa, a temperatura de 37°C.

A curva obtida foi do tipo A_L, i.e., aumento linear da solubilidade da substância ativa (AH) com o aumento crescente da concentração de HP β CD, atingindo um limite, após o qual houve um decréscimo da solubilidade; caracterizando o início do fenômeno de precipitação em soluções.

1 O fenômeno de precipitação em complexos foi observado durante
2 experimentos de solubilização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em
3 ciclodextrinas (GAO *et al.*, 1998 apud HANNA, BRAUER & GERMAIN, 2004).

4 A estequiometria encontrada foi de 1:1, pois a curva obtida foi do tipo A_L e o
5 coeficiente de correlação obtido foi maior que 0,99 (HIGUCHI & CONNORS, 1965).

7 **5.5.2- DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ESTABILIDADE (K_S)**

8
9 Usando o diagrama de solubilidade de fases foi possível determinar também a
10 constante de estabilidade, K_s , do complexo de inclusão do AH em HP β CD.

$$12 \quad K_{s(1:1)} = \frac{0.0769}{0.0359 (1 - 0.0769)}$$

$$15 \quad K_{s(1:1)} = 2320 \text{ M}^{-1}$$

16
17 A constante de estabilidade obtida na preparação presente foi de 2320 M^{-1} ,
18 i.e., aproximadamente cinco vezes superior àquela obtida por GREIÉ e
19 colaboradores 2000, que foi de 466 M^{-1} . O valor da K_s obtido em nosso estudo
20 encontra-se dentro da faixa considerada adequada para a formação do complexo de
21 inclusão, que é de $200\text{-}5000 \text{ M}^{-1}$ (BLANCO *et al.*, 1991).

1 Este valor elevado indica, entretanto, uma maior associação do AH em
2 HP β CD no complexo de inclusão obtido. Além disso, valores de Ks elevados
3 favorecem a passagem do princípio ativo através da membrana celular aumentando
4 a sua biodisponibilidade (DUCHÊNE & VAUTION, 1986 apud MATIOLI, MORES &
5 ZANIN, 2000).

6

7 Cálculo do aumento da solubilidade

8

9 $S_{\text{máx}} = 4,9338 \text{ mM/L}$

10

11 $S_o = 0,0359 \text{ mM/L}$

12 $n = S_{\text{máx}} / S_o$

13

14 $n = 137,4$

15

16 O aumento da solubilidade máxima foi da ordem de 137 vezes.

17

18

19

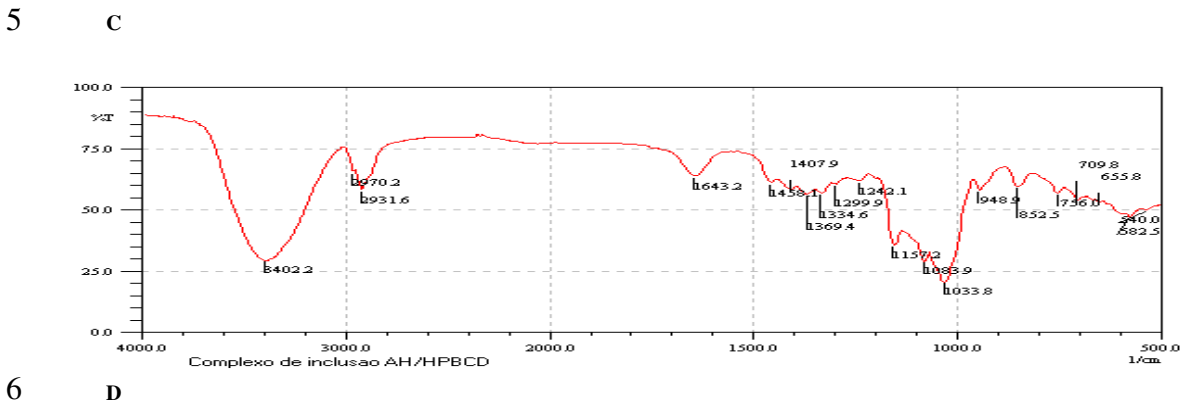
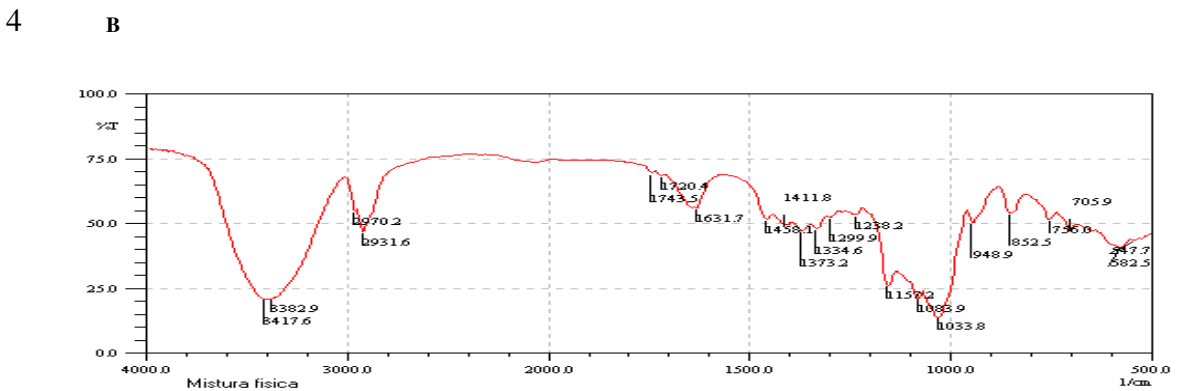
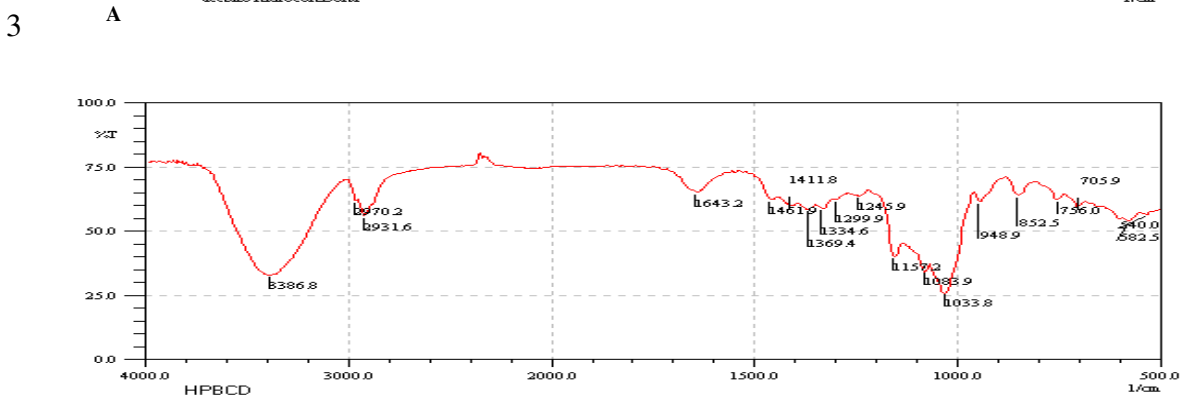
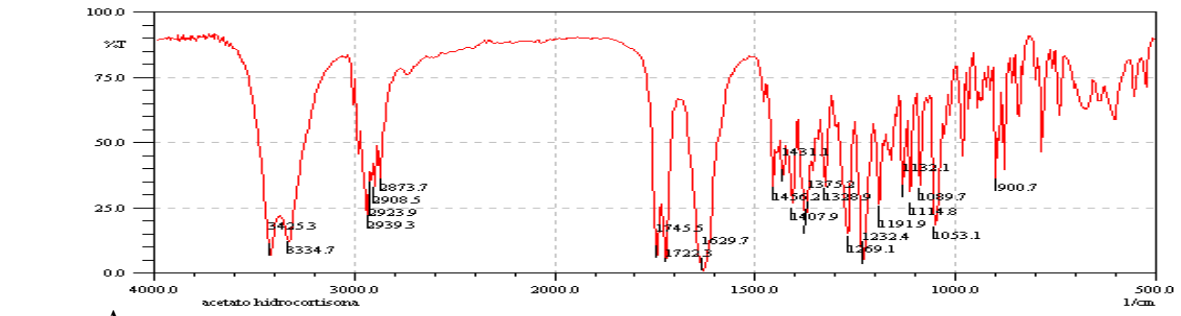
20

21

22

23

1 **5.5.3- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH EM HPβCD**
 2 **LIOFILIZADO POR IV COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTRI)**



7 Figura 24: Espectros de IV; A) AH matéria-prima, B) HPβCD matéria-prima, C)
 8 mistura física e D) complexo de inclusão do AH em HPβCD liofilizado.

O espectro de IV do AH matéria-prima A indicou bandas características do AH em 3425, 3334, 1745, 1723 e 1629 cm^{-1} .

O espectro de IV da HP β CD matéria-prima B demonstrou possuir bandas características em: 3386, 2970 e 2931 e 1643 cm^{-1} .

O espectro de IV da mistura física C indica algumas bandas características do AH matéria-prima com comprimentos de onda de 3417, 1743 e 1720 cm^{-1} .

No espectro de IV do complexo liofilizado verificamos que as bandas características do AH desapareceram completamente, caracterizando uma possível inclusão do AH na cavidade da HP β CD.

5.5.4- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH EM HP β CD LIOFILIZADO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A figura abaixo exhibe o termograma do AH, HP β CD, mistura física e complexo de inclusão AH em HP β CD.

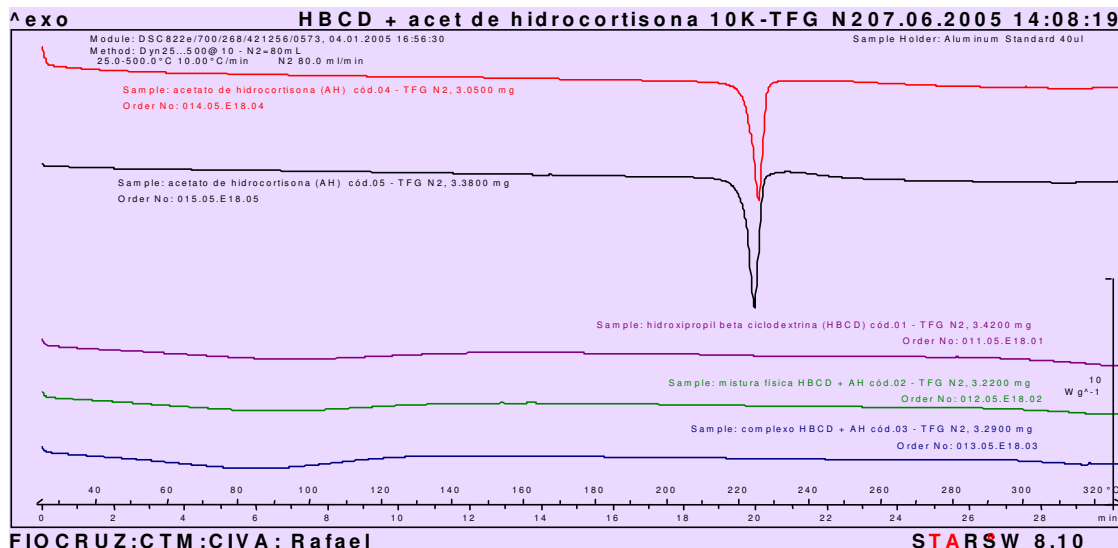


Figura 25: Termogramas; AH deg (---); AH galena (---); HP β CD matéria-prima (---); mistura física (---); complexo de inclusão AH em HP β CD liofilizado (---).

1 Os termogramas do AH das duas matérias-primas de fornecedores diferentes
2 demonstraram a absorção de calor (fusão) em temperaturas ligeiramente diferentes,
3 demonstrando uma maior pureza para o AH deg. As curvas termais são típicas de
4 substâncias cristalinas que é caracterizado pelo formato do efeito endotérmico, em
5 torno de 220°C com decomposição (LI *et al.*, 2005).

6 Os termogramas da HP β CD, mistura física e complexo de inclusão AH em
7 HP β CD demonstraram possuir as mesmas características, isso está relacionado ao
8 fato da concentração de HP β CD ser bem maior que a do AH, na mistura física e no
9 complexo de inclusão. Existe provavelmente uma interação da molécula do AH com
10 a HP β CD, mesmo sem que esta esteja incluso na cavidade.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

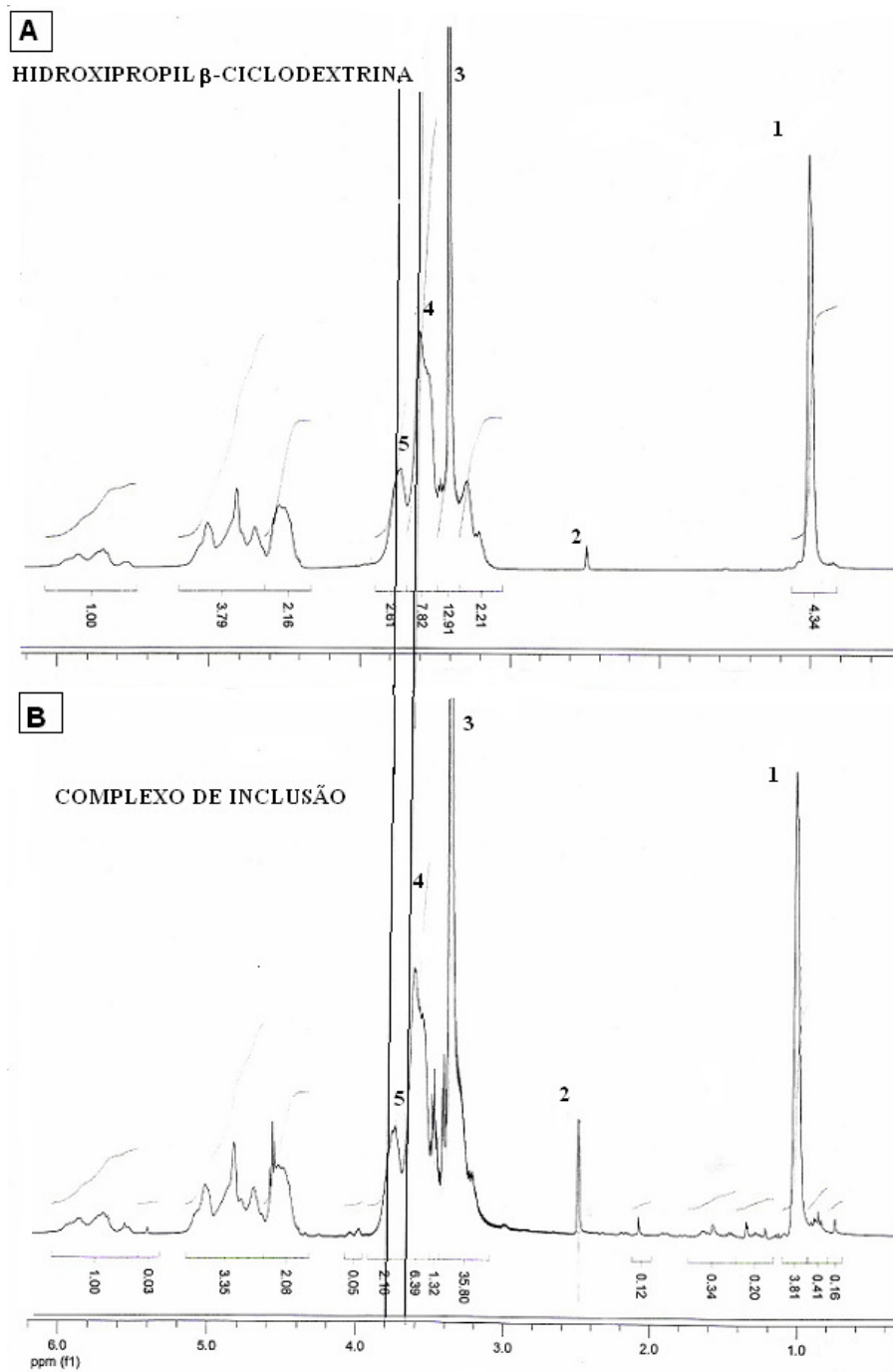
21

22

23

24

1 5.5.5- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD
 2 LIOFILIZADO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO
 3 (RMN-H¹)



4 Figura 26: Espectros de RMN de H¹. Em A- HP β CD, 1) metila da HP β CD; 2) DMSO;
 5 3) água do DMSO; 4) H-5 da HP β CD; 5) H-3,6 da HP β CD. B- Complexo de inclusão
 6 AH/HP β CD, 1) metila do AH; 2) DMSO; 3) água do DMSO; 4) H-5 do complexo de
 7 inclusão; 5) H-3,6 da HP β CD.

1 Nos espectros de RMN H^1 apresentados na figura 26, a HP β CD (A) mostrou
2 um pico de H-5 em 3,62 ppm, e outro pico de H-3,6 em 3,78 ppm.

3 O complexo de inclusão AH/HP β CD (B), mostrou um pico de H-5 em 3,66
4 ppm, e outro pico de H-3,6 em 3,80 ppm.

5 Dessa forma, foram observados deslocamentos de valores químicos para
6 níveis mais altos nos hidrogênios H-3,6 e H-5 da HP β CD, que são os responsáveis
7 pela interação molecular do complexo de inclusão. Comprovando-se a inclusão do
8 AH em HP β CD.

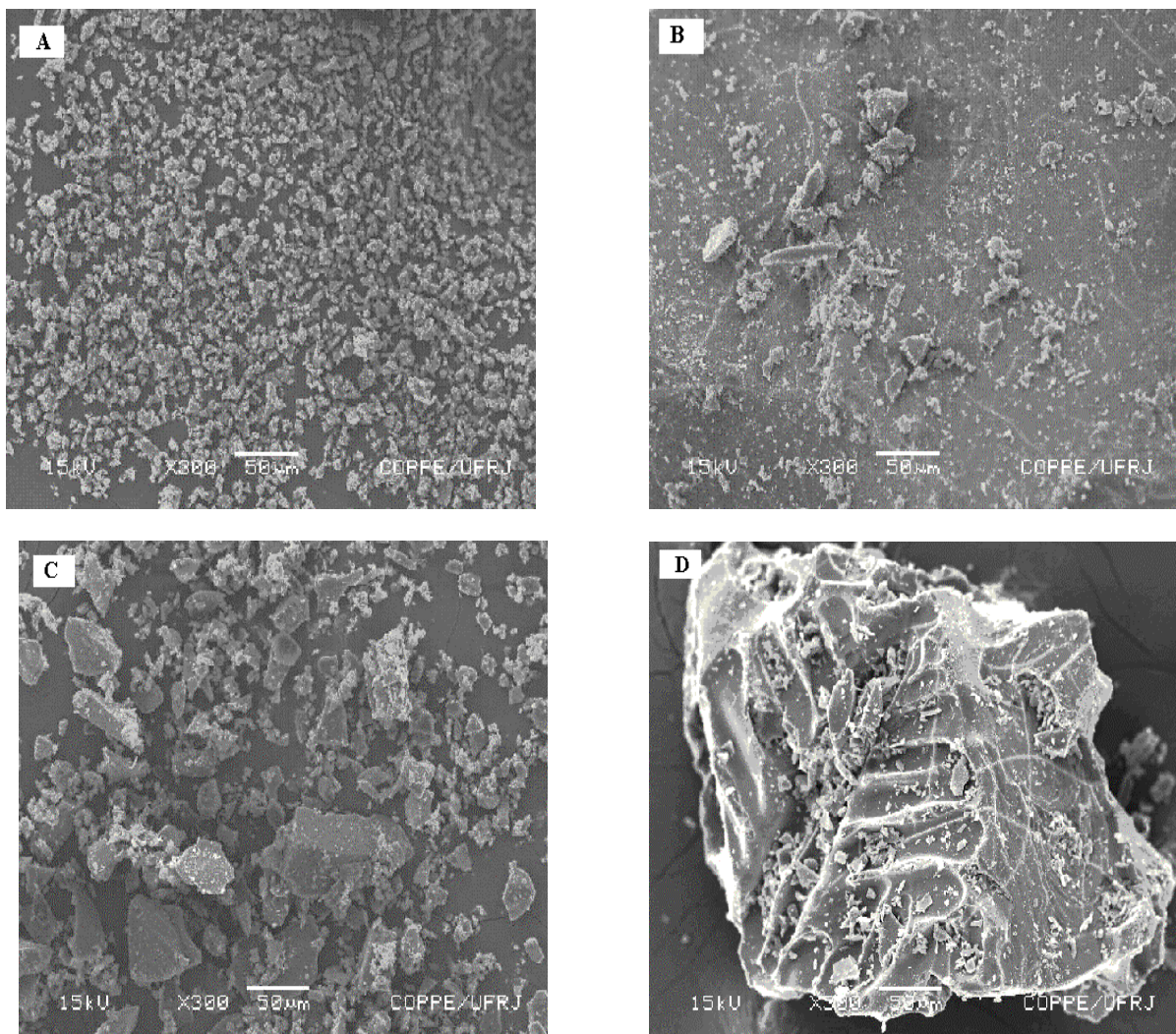
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

5.5.6- CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD LIOFILIZADO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

3

4 Foram realizadas as fotomicrografias das amostras do AH e HP β CD matéria-
5 prima com o propósito de serem comparadas com a mistura física e o complexo de
6 inclusão AH/HP β CD liofilizado, conforme mostra a figura 27, com aumento de 300
7 vezes, na qual pode-se ver o aspecto das amostras de forma global, com detalhes
8 da superfície das amostras diferentes entre si, indicando aspectos físicos típicos de
9 cada amostra.

10



11 Figura 27: Fotomicrografias feitas em MEV, aumento de 300x. Em A) AH; B)
12 HP β CD; C) mistura física; D) complexo de inclusão AH/HP β CD.

1 Na fotomicrografia do AH matéria-prima (figura 28, foto E), observou-se o
2 formato de cristais na superfície.

3 Na fotomicrografia da HP β CD no aumento de 5000x (figura 28, foto F), foram
4 visualizadas pequenas reentrâncias.

5 Na fotomicrografia da mistura física no aumento de 5000x (figura 28, foto G),
6 foram visualizados cristais do AH presentes na superfície da HP β CD.

7 Na fotomicrografia do complexo de inclusão do AH/HP β CD no aumento de
8 5000x (figura 28, foto H), detectamos apenas as partículas da HP β CD e a ausência
9 das partículas do AH, provavelmente devido à inclusão do AH na cavidade da
10 HP β CD.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

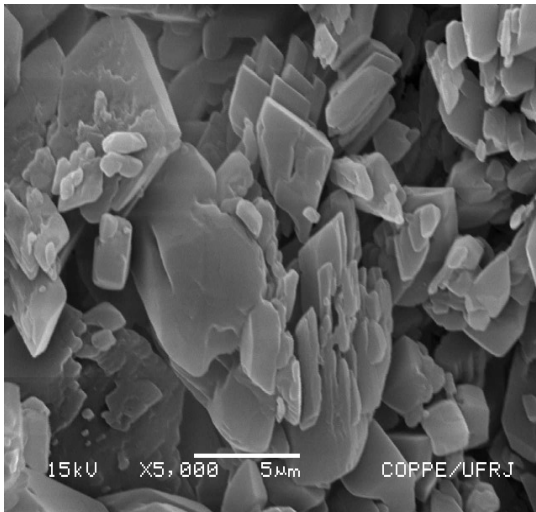
31

32

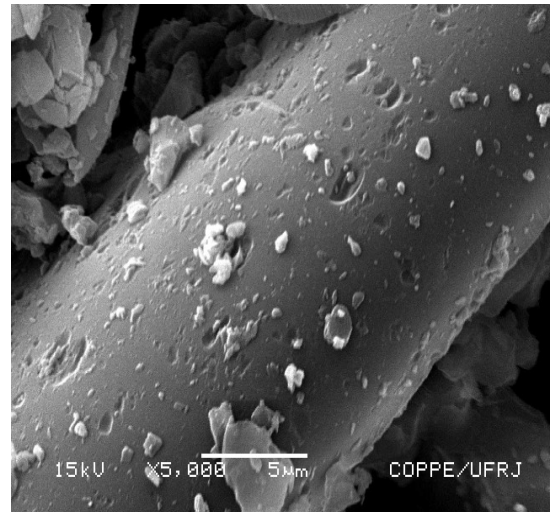
33

34

1 E

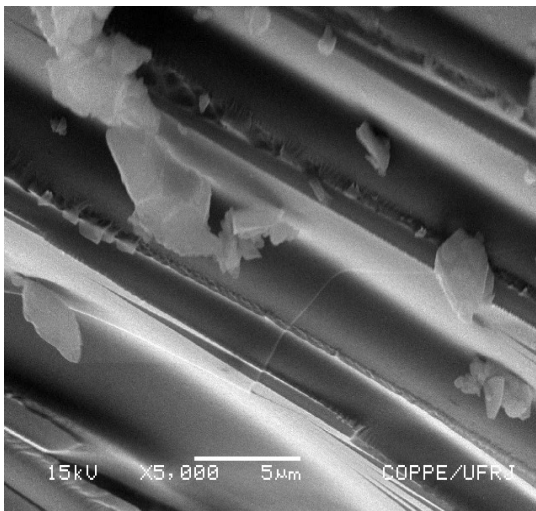


F

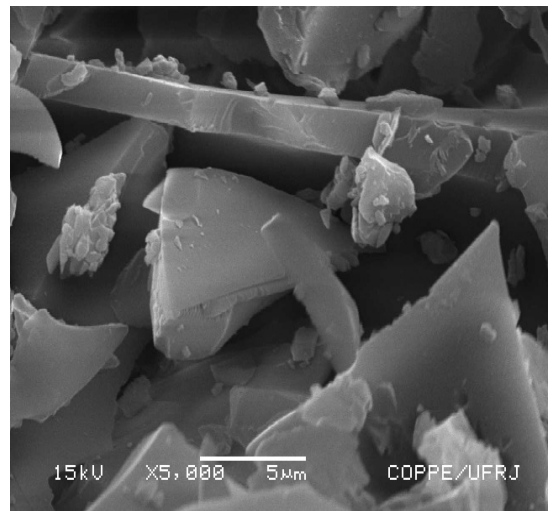


2

3 G



H



4 Figura 28: Fotomicrografias feitas em MEV, aumento de 5000x. Em E) AH; F)

5 HPβCD; G) mistura física; H) complexo de inclusão AH em HPβCD 5000x.

6

7

8

9

10

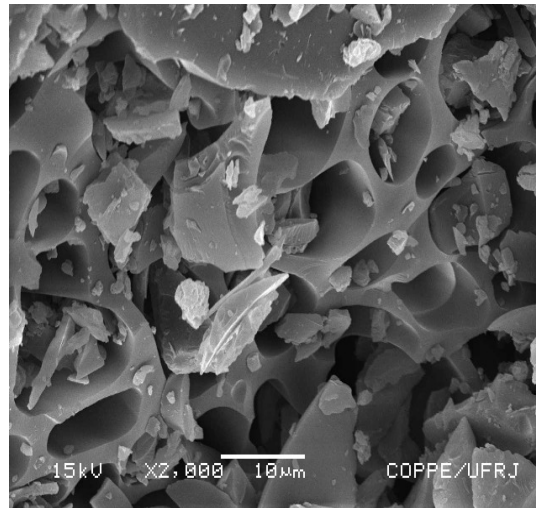
11

12

13

1 Na fotomicrografia do complexo de inclusão do AH/HP β CD no aumento de
2 2000x (figura 29), verificou-se na morfologia da superfície canalículos pertencentes à
3 cavidade da HP β CD e no seu interior a presença de cristais do AH, caracterizando a
4 inclusão do AH em HP β CD.

5



6 Figura 29: Fotomicrografia feita em MEV, aumento de 2000x, do complexo de
7 inclusão do AH em HP β CD.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1 **5.5.7- SOLUBILIDADE EM ÁGUA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO AH/HP β CD**
 2 **LIOFILIZADO E DA MISTURA FÍSICA**

3

4 As tabelas 27 e 28 apresentam os resultados da solubilidade do complexo de
 5 inclusão do AH em HP β CD e da mistura física.

6

7 Tabela 27: Resultados do teste de solubilidade do complexo de inclusão AH/HP β CD.

Massa do complexo de inclusão AH/HP β CD Liofilizado (g)	Massa correspondente de AH (g)	Volume adicionado de água (μ L)	Resultados
0.8667	0.01	10	Formou precipitado
0.8662	0.01	100	Formou precipitado
0.8658	0.01	300	Formou precipitado
0.8665	0.01	1000	Formou precipitado
0.8666	0.01	10000	Solubilizou

8

9 Tabela 28: Resultados do teste de solubilidade da mistura física AH/HP β CD.

Massa da mistura física AH/HP β CD(g)	Massa correspondente de AH(g)	Volume adicionado de água(μ L)	Resultados
0.8673	0.01	10	Formou precipitado
0.8667	0.01	100	Formou precipitado
0.8668	0.01	300	Formou precipitado
0.8664	0.01	1000	Formou precipitado
0.8667	0.01	10000	Formou precipitado

10

11

12 Através dos resultados do teste de solubilidade para o complexo de inclusão
 13 (tabela 27), verificou-se que foi possível solubilizar o acetato de hidrocortisona em
 14 água, quando incluso em HP β CD. Já com a mistura física não foi possível solubilizar
 15 o AH em água.

15

5.6- DESENVOLVIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE ACETATO DE HIDROCORTISONA

Estão apresentados abaixo os cromatogramas das condições cromatográficas ideais para a análise do AH na formulação, em presença do conservante e dos possíveis produtos de degradação.

Na figura 30, temos o cromatograma do padrão de AH, utilizando como fase móvel MeOH/AcCN/H₂O (25/35/40), temperatura da coluna 30°C e comprimento de onda 238 nm, nestas condições detectou-se o AH com um tempo de retenção em torno de 5 minutos.

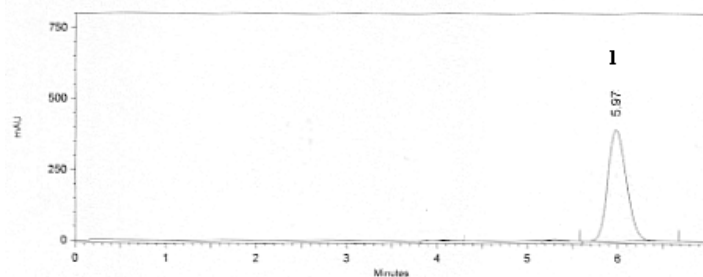
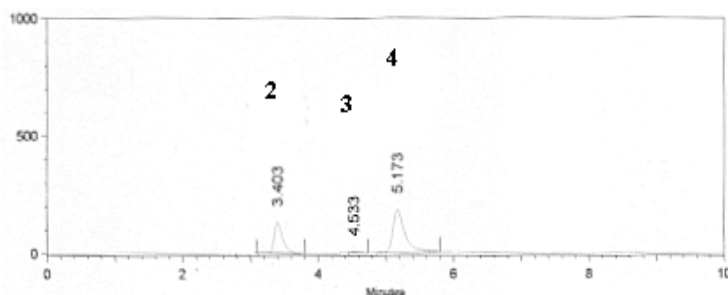


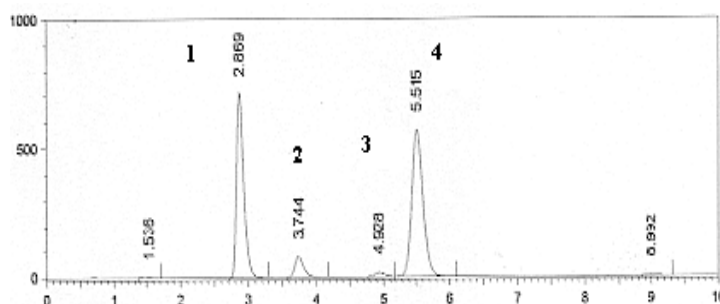
Figura 30: Cromatograma do padrão de AH . 1) AH.

Na figura 31, temos o cromatograma do AH sob estresse, realizado de acordo com a condição 5 descrita na tabela 11, utilizando como fase móvel MeOH/AcCN/H₂O (25/35/40), temperatura da coluna 30°C e comprimento de onda de 238 nm, nestas condições detectou-se os possíveis produtos de degradação do AH (picos 2 e 3), e a presença da matéria-prima em 4.



1 Figura 31: Cromatograma do AH matéria-prima sob estresse, condição 5. Em 2) e 3)
2 produtos de degradação; 4) AH

3 O cromatograma da preparação, condição 8 figura 32; fase móvel
4 MeOH/AcCN/H₂O (35:25:40) temperatura da coluna 30°C, apresentou 1) Nipagin, 2
5 e 3) produtos de degradação e 4) acetato de hidrocortisona, apresentou uma melhor
6 separação dos picos cromatográficos e com uma melhor resolução destes em
7 relação as outras condições cromatográficas da preparação, o tempo total de análise
8 foi de cerca de 7 minutos, sendo eleita como a condição ideal para a validação da
9 metodologia analítica.



10 Figura 32: Cromatograma da preparação, condição 8. Em 1) nipagin; 2) e 3)
11 produtos de degradação; 4) AH.

12
13
14
15
16
17
18

5.7- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A FORMULAÇÃO

5.7.1- LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliado segundo o coeficiente de correlação (r) obtida da curva de calibração do AH.

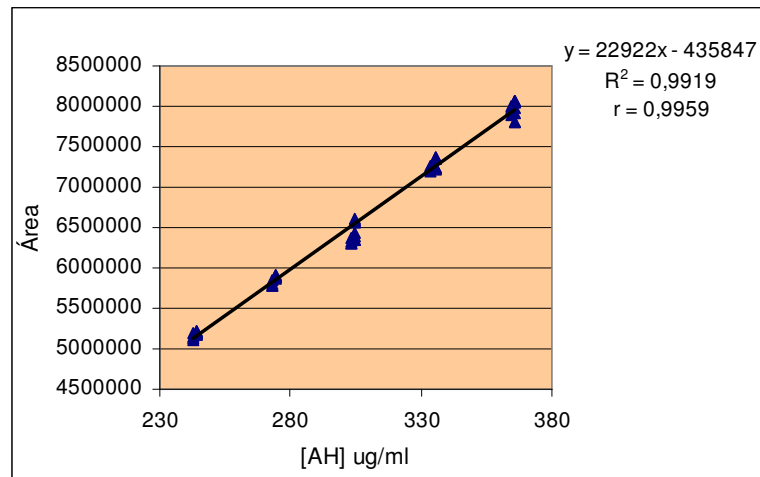


Figura 33: Curva de calibração do AH por CLAE. $y = ax + b$, onde: a é a inclinação da reta e b é o intercepto.

O coeficiente de correlação (r) encontrado na curva de calibração foi de 0,9959, aceitável pela ANVISA (BRASIL, 2003).

5.7.2- PRECISÃO

A precisão do método foi realizada através de 6 pesadas a 100% da concentração da formulação 3.

1 Tabela 29: Parâmetros de precisão do método analítico

Massa das formulações 2 e 3 (g)	Teor (%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
2.0269	100.4	0.7649	0.7629
2.0548	98.5		
2.0393	101.6		
2.0465	97.7		
2.0398	101.8		
2.0568	102.2		

2

3

Um desvio padrão relativo menor que 2.0% é considerado bom (HASWELL,

4

1992). Um desvio padrão relativo menor que 5.0% é aceitável (BRASIL, 2003).

5

6

5.7.3- EXATIDÃO

7

8

A exatidão do método foi avaliada através de 3 concentrações da formulação

9

3; a 80%, 100% e 120%, 3 pesadas de cada.

10

11

Tabela 30: Parâmetros de exatidão do método analítico

Concentração da formulação (%)	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%) Recuperado
80	239.1	243.6	101.8
	240.6	247.0	102.6
	242.2	244.0	100.7
100	308.4	310.9	100.8
	306.2	313.0	102.2
	310.8	314.2	101.1
120	361.6	360.3	101.1
	364.6	368.1	100.9
	363.4	360.6	99.06

12

13

14

15

1 5.7.4- ESPECIFICIDADE

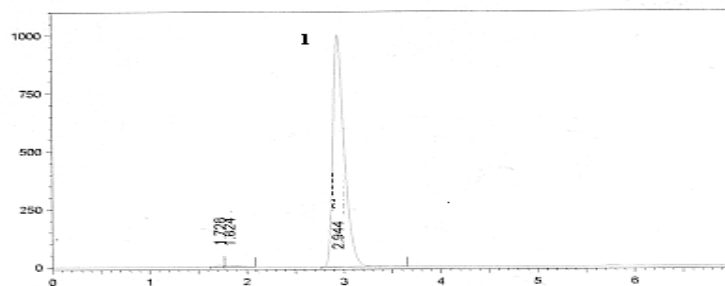
2

3 A especificidade do método foi avaliada através da interferência dos
4 excipientes das formulações. Abaixo está ilustrado o cromatograma da base da
5 formulação 1 e 2 com metilparabeno e base da formulação 3 com sorbato de
6 potássio.

7 Verificou-se que a HP β CD não interferiu na análise, pois não foi detectada a
8 presença de outro pico além do 1.

9 O cromatograma das formulações demonstrou que o tempo de retenção do
10 metilparabeno ficou em torno de 2,9 minutos.

11



12

13 Figura 34: Cromatograma da base da 1^a e 2^a formulações, em pico 1) metilparabeno.

14

15

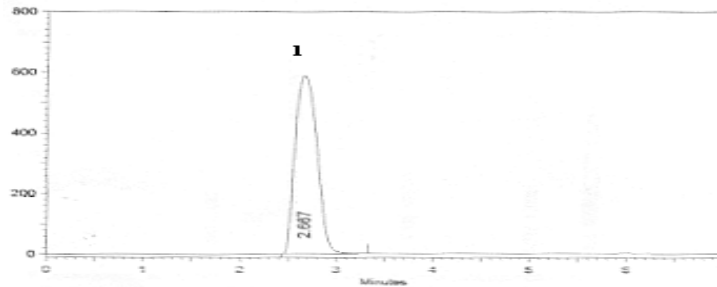
16

17

18

1 O cromatograma da formulação contendo sorbato de potássio como
2 conservante, indicou que este, assim como o outro conservante, não interferiu na
3 metodologia de análise, uma vez que o sorbato de potássio foi detectado com tempo
4 de retenção de 2,5 minutos.

5



6 Figura 35: Cromatograma da base da 3ª formulação, pico 1) sorbato de potássio.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

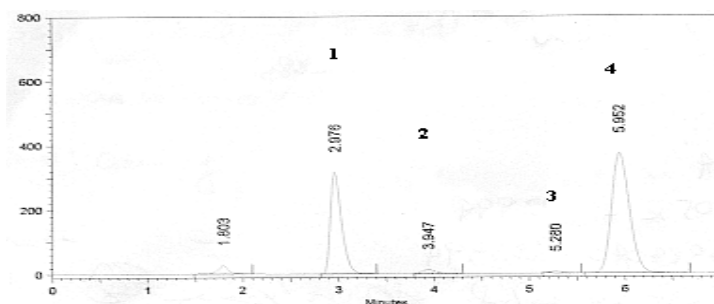
25

1 5.8- ANÁLISE QUANTITATIVA DO AH NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

2

3 A figura 36 abaixo, exibe o cromatograma da separação dos componentes da
4 formulação líquida de AH incluso em HP β CD.

5 Os picos cromatográficos correspondem a 1: metilparabeno, 2 e 3: produtos
6 de degradação e 4: AH.



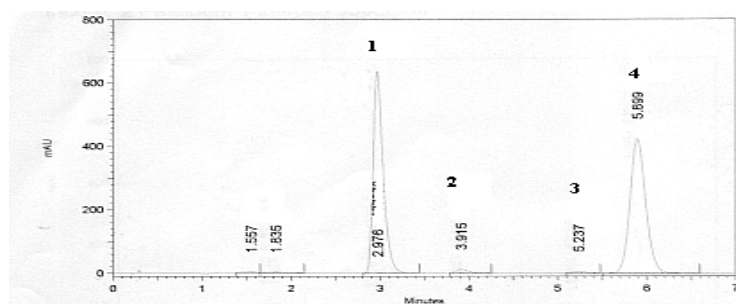
7 Figura 36: Cromatograma da 1^a formulação.

8

9 A figura 37 abaixo exibe o cromatograma da 2^a formulação.

10 Os picos cromatográficos correspondem a 1: metilparabeno, 2 e 3: produtos
11 de degradação e 4: AH.

12



13 Figura 37: Cromatograma da 2^a formulação.

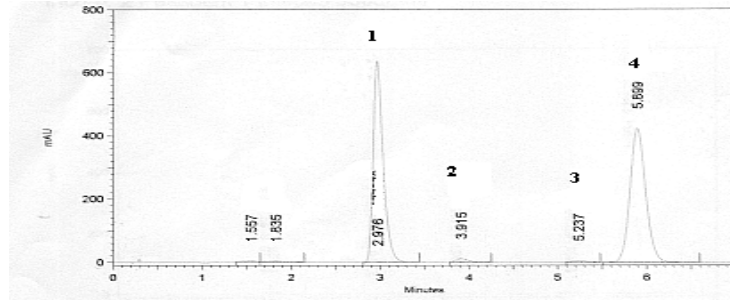
14

15

16

17

- 1 A figura 38 abaixo exhibe o cromatograma da 3^a formulação.
 2 Os picos cromatográficos correspondem a 1: sorbato de potássio, 2 e 3:
 3 produtos de degradação e 4: AH.
 4



5 Figura 38: Cromatograma da 3^a formulação.

- 6 Os resultados demonstraram que os percentuais de AH nas três formulações
 7 foram bem próximos, independentemente da concentração e do tipo de conservante
 8 utilizado.
 9

10

11 Tabela 31: Teor das formulações de acetato de hidrocortisona incluso em HP β CD.

Formulações	Teor (%) média
1	101,2 \pm 1,25
2	99,5 \pm 1,63
3	101,4 \pm 1,74

12

13

5.9- ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ACETATO DE HIDROCORTISONA EM HP β CD

No modelo do complexo de inclusão (AH/HP β CD) obtido por modelagem molecular (figura 39, visão frontal e lateral), foi possível verificar que houve a inclusão da molécula do AH na cavidade da molécula de HP β CD, e que existe uma proximidade entre os átomos de carbono ligados aos hidrogênios 3 e 5 das unidades de glicose da HP β CD na superfície da cavidade com a molécula do AH.

Os tipos de interações intermoleculares envolvidas no processo de inclusão são forças de Van der Waals, não havendo ligações de hidrogênio, já que os átomos de oxigênio da molécula de HP β CD estão mais internalizados, i.e., não estão localizados na superfície da cavidade.

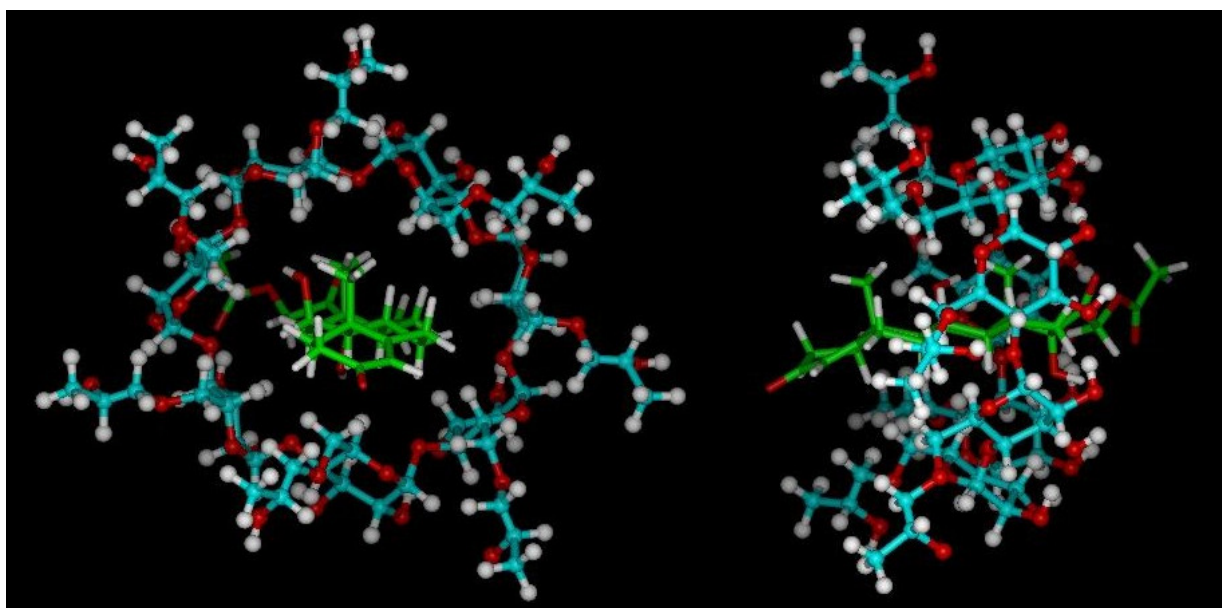


Figura 39: Proposta de modelagem molecular, visão frontal e lateral, respectivamente, do complexo de inclusão do AH em HP β CD, o AH está representado em modelo de bastão onde os átomos de carbono estão representados em cor verde e a HP β CD está representada em modelo de bastão e bola onde os átomos de carbono estão representados em cor azul.

1 Na figura 40 do modelo do complexo de inclusão proposto por modelagem
2 molecular (visão lateral) foi possível visualizar que a parte da molécula do AH que
3 está incluída na cavidade da HP β CD é a região central, correspondendo aos anéis B,
4 C e D da unidade ciclopentano-peridrofenantreno e a parte que não está incluída são
5 as carbonilas do anel A do grupamento acetato.

6 No modelo proposto por modelagem molecular foi possível verificar a inclusão
7 do AH na cavidade da HP β CD utilizando o encaixe manual, já que não houve quebra
8 de ligações de ambas as moléculas (AH e HP β CD) e as mudanças conformacionais
9 observadas nas moléculas antes e após o encaixe foram muito pequenas. As
10 alterações conformacionais foram avaliadas pelos valores de desvio da raiz dos
11 mínimos quadrados (RMS) das distâncias interatômicas entre todos os pares de
12 átomos das moléculas antes e após o encaixe. O desvio de RMS para a HP β CD
13 antes e após o encaixe foi de 1,451 Å e para o AH foi de 0,174 Å. No caso da
14 HP β CD o desvio é maior devido a maior liberdade conformacional das cadeias
15 laterais do grupo hidroxipropil e no caso do AH o desvio é bem pequeno porque a
16 estrutura é muito rígida.

17

18

19

20

21

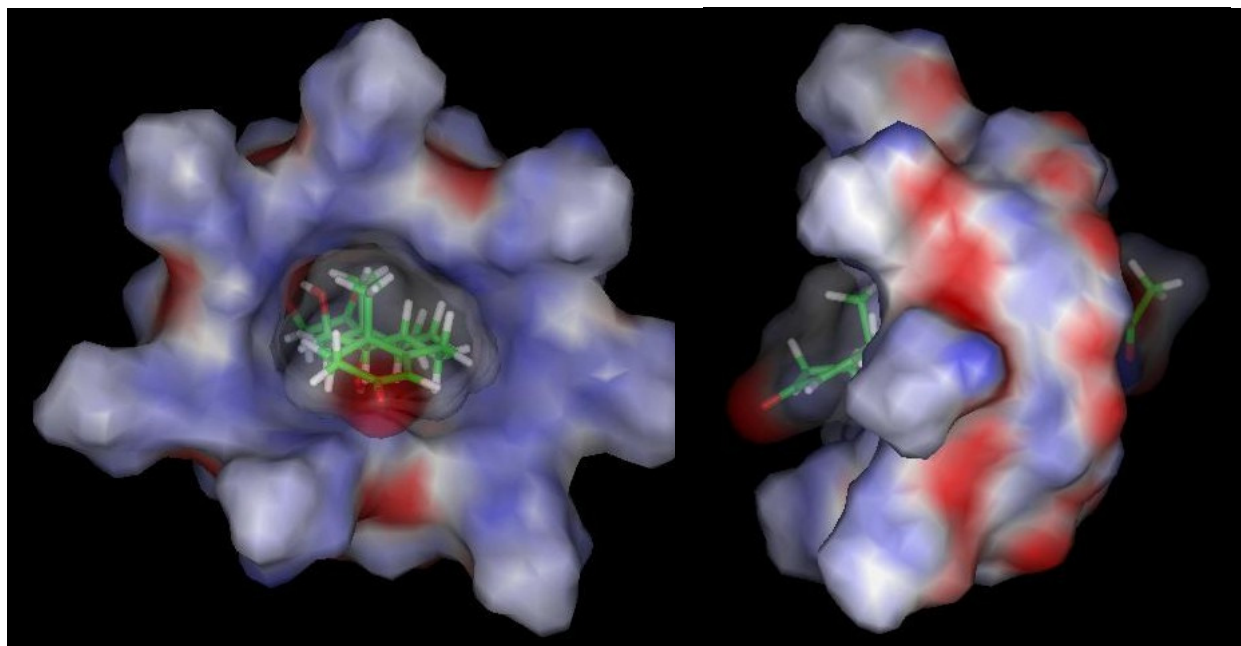
22

23

24

25

26



1 Figura 40: Proposta de modelagem molecular, formato 3D, visão frontal e lateral,
2 respectivamente, do complexo de inclusão do AH em HP β CD. Representando a
3 superfície do potencial eletrostático molecular do AH (superfície transparente) e da
4 HP β CD (superfície sólida).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

1 5.10- AVALIAÇÃO DA ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO COMPLEXO 2 DE INCLUSÃO DO AH EM HP β CD LIOFILIZADO

3

4 A figura abaixo, mostra a difração de raios-X das amostras, 1) AH; 2) HP β CD;
5 3) mistura física e 4) complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado.

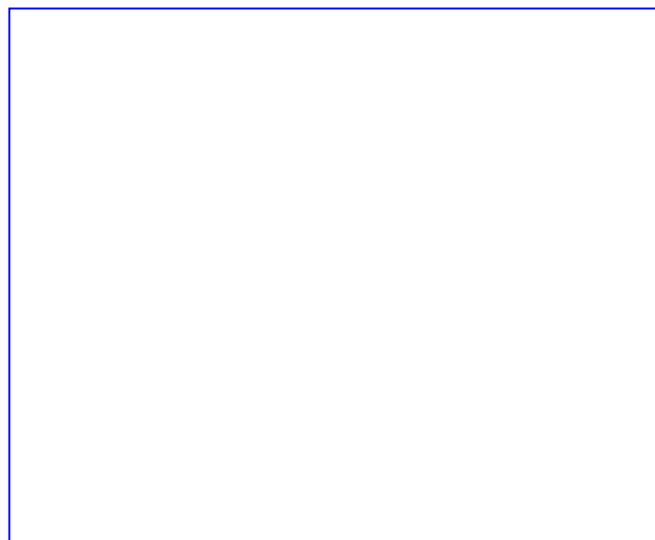
6 A análise de difração de raios-X referente ao AH demonstrou a presença de
7 vários picos com boa resolução, indicando ser um cristal.

8 As outras amostras, só possuem ruídos, indicando amostras amorfas, 2)
9 HP β CD; 3) mistura física e 4) complexo de inclusão AH/HP β CD liofilizado.

10 Não houve distinção entre os sinais de difração dos raios-X para essas
11 amostras. Deve-se ao fato, de que nas amostras 3 e 4, as concentrações de HP β CD
12 são bem superiores as de AH (134 mM e 5 mM), respectivamente, não sendo
13 possível detectar os sinais de AH nessas amostras.

14

15



16 Figura 41: Difração de raios-X, referentes: 1) acetato de hidrocortisona matéria-
17 prima; 2) HP β CD matéria-prima; 3) mistura física e 4) complexo de inclusão do AH
18 em HP β CD liofilizado.

19

20

1 **VI- CONCLUSÕES**

2

3 - A técnica de diagrama de solubilidade de fases (HIGUCHI & CONNORS, 1965)
4 permitiu de maneira rápida, simples e eficiente, o desenvolvimento do complexo de
5 inclusão do acetato de hidrocortisona (AH) em hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD),
6 preparado à 37°C com agitação por 1 hora, utilizando água como solvente.

7

8 - O melhor percentual de inclusão obtido foi na razão de 5 mM (AH) para 134 mM de
9 HP β CD e alcançou o percentual máximo a 91,5%.

10

11 - O método de solubilidade de fases se mostrou adequado para a determinação da
12 estequiometria do complexo de inclusão do AH em HP β CD.

13

14 - A estequiometria do complexo de inclusão obtida foi de 1:1. A constante de
15 estabilidade do complexo formado foi de 2320 M⁻¹, demonstrando uma adequada
16 associação entre o acetato de hidrocortisona e a cavidade da HP β CD.

17

18 - Foi possível quantificar o percentual de incluso do AH em HP β CD pela técnica de
19 UV e caracterizá-lo por IV, MEV e RMN H¹.

20

21 - Puderam ser analisadas por MEV as características físicas da superfície das
22 amostras do AH, HP β CD, mistura física e complexo de inclusão.

23

24

25

26

1 - Foi possível aumentar consideravelmente a solubilidade em água do AH.

2

3 - Um método analítico para a quantificação do AH em HP β CD por CLAE em fase
4 reversa foi desenvolvido e validado, demonstrando linearidade, precisão
5 (repetibilidade), exatidão e sensibilidade de acordo com a Resolução 899/2003 do
6 Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MS/ANVISA), para
7 análise da formulação levando-se em consideração os produtos de degradação.

8

9 - A proposta de modelagem molecular comprovou a possibilidade de inclusão e
10 confirmou a relação de 1:1 (AH/HP β CD). Este teste deve ser indicado, sempre que
11 possível, para o início do trabalho, de forma a poupar tempo e testes com outras
12 ciclodextrinas.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 **VI- PERSPECTIVAS FUTURAS**

2

3 - Avaliar a cinética de dissolução in vitro do complexo de inclusão AH em HP β CD
4 liofilizado.

5

6 - Comparar a constante de estabilidade do complexo de inclusão obtida pelo método
7 de diagrama de solubilidade de fases com o método de Benesi – Hildebrand.

8

9 - Aprimorar, farmacotecnicamente a formulação líquida de acetato de hidrocortisona.

10

11 - Verificar a estabilidade da formulação de acetato de hidrocortisona desenvolvida
12 em comparação com aquela manipulada na Farmácia Universitária.

13

14 - Realizar estudos de biodisponibilidade da formulação desenvolvida.

15

16

17

18

19

20

21

22

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANSEL, C. H.; POPOVICH, G. N.; ALLEN, V. L. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p. 249-259; 266-273.

ARCHONTAKI, A. H.; VERTZONI, V. M.; ATHANASSION, M. H. M. Study on the inclusion complexes of bromazepam with β and β -cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p.761-769, 2002.

BARY, R. A.; TUCKER, E. I.; DAVIES, M. N. Considerations in the use of HP β CD in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortisone. **European J. of Pharmac. And Biopharmac.**, v. 50, p. 237-244, 2000.

BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E. V.; BEIJNEN. Cyclodextrins in pharmaceutical field. **Drug Dev. Ind. Pharmaceutical**, v. 17, p. 1503-1549, 1991.

BLANCO, J.et al. Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 17, p. 943-957, 1991.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003. Disponível em < [http://e-legis.anvisa.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word+valida%c3a7%c3...>](http://e-legis.anvisa.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word+valida%c3a7%c3...). Acesso em 25/10/2004.

BRITISH pharmacopeia. London: The Stationery Office, 2004. p. 241-243; 982-984; 2482-2484.

BRITTO, O. F. A. M.; JÚNIOR, N. S. C.; SANTOS, F. H. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos.

Química Nova, v. 27, n. 6, p. 882-888, 2004.

CASS, B. Q.; DEGANI, G. L. A. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Editora UFScar, 2001. p. 32.

CDER/FDA. Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation. 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Acesso em: 12/01/2005.

CITERNESI, U.; SCIACCHITANO, M. Ciclodextrinas em dermocosméticos funcionais. **Cosmetics & Toiletries**, v. 5, p. 50-55, 1995.

DALE, M. M.; RANG, H. P.; RITTER, M. J. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

DÄR, A. **Tecnologia Farmacêutica**. Zaragoza: Editoriat Acribia, 1981.

DAVIES, M. N.; WANG, G.; TUCKER, G. I. Evaluation of a hydrocortisone /hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 201-209, 1997.

EUROPEAN pharmacopeia. 3. ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997. p. 978-979.

FORGO, P.; GONDOS, G. A study of β -cyclodextrin inclusion complexes with progesterone and hydrocortisone using rotating frame overhauser spectroscopy. **Monat. Chem.**, v. 133, p. 101-106, 2002.

FORGO, P.; VINCZE, I.; KOVÉR, E. K. Inclusion complexes of ketosteroids with β -cyclodextrin. **Steroids**, v.68, p. 321-327, 2003.

GINÉS, M. J. et al. Determination of stoichiometry of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid β -cyclodextrin complexes in solution and in solid state. **Thermochimica Acta**, v. 312, p. 53-58, 1998.

GOODMAN & Gilman's. The Pharmacological basis of therapeutics. 8. ed. New York: Pergamon Press, 1990.

GREIÉ, F. I. et al. Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- β -cyclodextrins inclusion complex. **European J. of Pharmac. Sciences**, v. 9, p. 373-379, 2000.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. São Paulo: Ed. Unicamp, 1997. p. 183-195.

HÁJKOVÁ, R. et al. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 921-927, 2003.

KIBBE, A. H. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 2. ed. Washington: American Pharmaceutical Association; London: Pharmaceutical Press, 1994. p. 310-312, 390-393.

HANNA, K.; BRAVER, C.; GERMAIN, P. Cyclodextrin-enhanced solubilization of pentachlorophenol in water. **Journal of Environmental Management**, v. 71, p. 1-8, 2004.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Co., 1995. p. 521-530.

HASWELL, S. J. **Practical guide to chemometrics**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 5-15.

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

Q2B: validation of analytical procedures methodology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH), 1997, Switzerland: ICH Steering Committee, 1997. p. 27463. (US FDA Federal Register, v. 62)

KARTAL, M. L. C. Method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 26, p. 857-864, 2001.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KRISTMUNDSTÓTTIR, T.; LOFTSSON, T.; HOLBROOK, W., P. Formulation and evaluation of hydrocortisone solution for the treatment of oral disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 139, p. 63-68, 1996.

LEHNER, J. S.; MULLER, W.; SEYDEL, K. J. Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on the antimicrobial action of preservatives. **Journal Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 186-191, 1994.

LI, N. et al. Study of physicochemical properties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution. **Journal of Pharmac. And Biomedical Analysis**, v. 59, part A, p. 2759-2766.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, E. M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. **Journal Pharmac. Sciences**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MATTHÍASSON, K.; MÁSSON, M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 262, p. 101-107, 2003.

LOFTSSON, T.; PETERSEN, D., S. Cyclodextrin solubilization of ETH-615, a zwitterionic drug. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, n. 4, p. 365-370, 1998.

MARTÍN, L. et al. Detection and characterization of cyclodextrin complexes with β -carbolines derivatives by spectroscopic techniques. **Journal Pharmac. and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 991-1001, 2003.

MÁSSON, M. et al. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. **Journal Controlled Release**, v. 59, p. 107-118, 1999.

MATIOLI, G.; MORES, F. F.; ZANIN, M. G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Ed. Universidade Estadual de Maringá, 2000. p. 17.

MUKNE, P. A.; NAAGARSENKER, S. M. Triamterene- β -cyclodextrin systems: Preparation, characterization and in vivo evaluation. **AAPS Pharmascitech**, v. 5, 2004. (Article: 19)

MURA, P.; MAESTRLLI, F.; CIRRI, M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl β -cyclodextrin and aminoacids. **Journal Pharma. Sciences**, v. 260, p. 293-302, 2003.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1991. v.1.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. **Journal Pharmac. Sciences**, v. 90, p. 976-986, 2001.

RUAN, P. L. et al. Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. **Journal of Pharmac. And Biomedical Analysis**, v.38 ,n.03, 2005 Disponível em <[http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 05/07/2005.

SHABIR, A. G. 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.

SHEN, L-Y. et al. Study on structure and characterization of inclusion complex of gossypol/ β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta**, , v. 61, part A, p. 1025-1028, 2005.

SILVA, N. I. et al. Ritmo de crescimento de crianças com hiperplasia adrenal congênita da supra-renal em tratamento com baixas doses de hidrocortisona. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, p. 120-125, 2005.

SIVERSTEIN, M. R.; BASSLER, C. G.; MORRIL, C. T. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994. p. 99-100, 108-110.

SINGH, V.; AITHAL, K. Inclusion complex of plumbagin with β -cyclodextrin as evidenced by spectral data and molecular modelling. **Pharmazie**, v. 53, p. 208-210, 1988.

SMITH, W. W.; MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration enhancers: the fundamentals. In: **Percutaneous Penetration Enhancers**: CRC Press, 1995. p.1-4.

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

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1988. p. 101-103.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins in drug formulations. **Pharmaceutical Technology International**, v. 3, part 2, p.16-24, 2001.

UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. **CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 3, p. 1-40, 1987.

UGWU, O. S. et al. Characterization of complexation of diflunisal with hydroxypropyl β -cyclodextrin. **Journal of Pharm. and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 391-397, 1999.

THE UNITED States Pharmacopeia. 27. d. Rochville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. p. 925-928, 2747.

VENTURA, A. C. et al. Preparation of celecoxib-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 624-631, 2005.

VIANNA, L. F. R. et al. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. **Int. J. Pharm.**, v. 167, p. 205-217, 1998.

VIJAY, K. P. et al. The High CO_2^- solubility of per – acetylated α -, β -, and γ -cyclodextrin. **Fluid Phase Equilibria**, v. 211, p. 211-217, 2003.

VILAR, L.; CASTELLAR, E.; MOURA, E. **Endocrinologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 2000. p. 415-416.

VOIGT, R. **Tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

WILSON, D. J. et al. **Willians textbook of endocrinology**. 9. ed., USA; Editor: W. B. Saunders, 1999. p. 598; 1361; 1367.h

ZHEMMING, D. et al. Study on vitamin k3 cyclodextrin inclusion complex and analytical application. **Spectrochimica Acta**, v. 59, part A, p. 2073-2079, 2003.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of inclusion complex warfarin β -cyclodextrin. **Int. J. Pharmac.**, v. 291, p. 3-10, 2005.