

AMARILIS SCREMIN PAULINO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, ESTUDOS DE ESTABILIDADE E
DESENVOLVIMENTO DE UMA SUSPENSÃO CONTENDO DEFLAZACORTE**

FLORIANÓPOLIS

2009

AMARILIS SCREMIN PAULINO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, ESTUDOS DE ESTABILIDADE E
DESENVOLVIMENTO DE UMA SUSPENSÃO CONTENDO DEFLAZACORTE**

Dissertação apresentada por Amarilis Scremin Paulino ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos – Desenvolvimento de formas farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso

**“Validação de métodos analíticos,
estudo de estabilidade e
desenvolvimento de uma suspensão
contendo DEFLAZACORTE”**

POR

Amarilis Scremin Paulino

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelos membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval (UFRGS – Membro titular)

Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva (UFSC – Membro titular)

Prof. Dr. Flávio H. Reginatto (UFSC – Membro titular)

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC - Orientadora)

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 24 de abril de 2009.

Dedico este trabalho ao meu esposo Niraldo e aos meus filhos Angelo e Amabile pelo amor, carinho, compreensão e incentivo nesta longa caminhada.

A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado e guiado os meus caminhos nesta longa caminhada.

- À minha orientadora e amiga, Prof. Dra. Simone, por todos os ensinamentos técnicos, científicos e principalmente pelo exemplo de vida. Que Deus a abençoe sempre, para que possa continuar sendo sempre esta pessoa maravilhosa. Obrigado de coração.
- Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Marcos Segatto.
- Ao Prof. Dr. Braga e ao Prof. Dr. Flávio que apesar de não estar no laboratório faz parte da família
- Aos meus colegas do laboratório que se transformaram em grandes amigos: Mônica, Gis, Hellen, Charise, Fábio, Rafael, Bruno, Lari, Paulo, Silvia, Gabi e Letícia. Cassi e Patrik.
- À Dona Ivonete, Solange e a Claudinha.
- Ao meu esposo e meus filhos que amo muito. Acho que não tenho palavras para agradecer.
- À minha família, que estava sempre pronta a me ajudar nos momentos difíceis.
- À Viviane Vieira da Cunha de Aguiar pela doação da amostra de deflazacorte, Laboratório Neo Química Com. e Ind. Ltda.
- À UNICAMP, em especial a Prof. Dra. Alexandra Sawaya e o Prof. Dr. Marcos Eberlin.
- À Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Prof. Dr. Braga.
- À Universidade Bandeirantes de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Niraldo Paulino.
- À Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente aos professores do PG-FAR.

***“Jamais desanimeis, embora
venham ventos contrários”
(Santa Paulina)***

RESUMO

O Deflazacorte (DFZ) é um glicocorticóide derivado da prednisolona indicado no tratamento de doenças reumáticas, dermatológicas, alérgicas, do tecido conjuntivo, gastrointestinais, transplante de órgão entre outras. Apresenta a vantagem da redução significativamente menor na perda óssea, manutenção dos níveis de colesterol, menor efeito diabetogênico e menor perda de massa muscular quando comparado a outros glicocorticóides. Apesar de seu amplo uso na terapêutica, não há registros de monografias farmacopeicas descrevendo métodos para quantificação de DFZ em suspensão, e há escassas informações sobre a estabilidade do fármaco. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver, otimizar e validar métodos para análise qualitativa e quantitativa em suspensão oral; avaliar a estabilidade do fármaco, isolar e identificar o principal produto de degradação; avaliar a atividade antiinflamatória e desenvolver suspensão oral contendo DFZ. A caracterização do DFZ foi realizada através de estudos termoanalíticos, espectroscópicos e cromatográficos. Este foi devidamente caracterizado e apresentou uma pureza de 98,98 %. Foram desenvolvidos e validados os métodos espectrofotométricos (UV e Vis) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise do DFZ em suspensão. Para o controle de qualidade do DFZ em suspensão oral, os métodos que demonstraram maior eficiência foram UV e CLAE. O estudo de estabilidade do DFZ foi realizado em meio ácido (HCl 0,1N), alcalino (NaOH 0,1N) e em co-solventes farmacêuticos; tampão acetato, tampão fosfato, glicerina, sorbitol e PEG-400). Nos estudos de estabilidade foi demonstrado que o DFZ degrada mais rapidamente em meio alcalino, e com menor degradação em tampão acetato pH 5,0 com a adição de PEG-400. O principal produto de degradação (DDP1) foi isolado a partir da hidrólise em meio alcalino e foi identificado através de técnicas espectroscópicas como 21-hidroxideflazacorte. DDP1 foi testado comparativamente com DFZ em modelos animais de inflamação aguda *in vivo*, e ensaios em cultura celular *in vitro*. Os ensaios farmacológicos demonstraram que o DFZ e o seu metabólito 21-hidroxideflazacorte apresentam efeito antiinflamatório *in vivo* e *in vitro*. Além disso, foram desenvolvidas quatro suspensões contendo DFZ, que foram avaliadas quanto à estabilidade acelerada. Nestes ensaios, as formulações F1 e F2 contendo carboximetilcelulose sódica como espessante foram mais estáveis que as formulações F3 e F4 contendo hidroxipropilmetilcelulose. Baseado nestes resultados foi possível concluir que o DFZ foi identificado e quantificado através de técnicas termoanalíticas, espectroscópicas e CLAE, possibilitando usá-lo como substância química referência. Estes métodos também demonstraram ser reprodutíveis para o controle de qualidade do DFZ em suspensão oral. Através do estudo de estabilidade química do DFZ em meio aquoso foi demonstrado que a degradação é dependente de pH e o uso de co-solventes farmacêuticos interferem diretamente na estabilidade do DFZ. Nos ensaios farmacológicos, o 21-hidroxideflazacorte demonstrou efeito antiinflamatório *in vivo* e *in vitro* superior ao DFZ. Na avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas, F1 foi considerada mais estável, mantendo os parâmetros dentro do limite de 5 % e conferindo um prazo de validade de 24 meses. Os resultados obtidos contribuem para o estabelecimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo DFZ, especialmente em suspensões.

Unitermos: Deflazacorte, 21-hidroxideflazacorte, antiinflamatório, suspensão oral, estabilidade.

ABSTRACT

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS, STABILITY STUDIES AND DEVELOPMENT OF A SUSPENSION CONTAINING DEFLAZACORT

Deflazacort (DFZ) is a corticosteroid derivative from prednisilone indicated in the treatment of rheumatic, dermatological, allergic, respiratory, gastrointestinal, and connective tissue-diseases, DFZ is used also during the organ transplantation and other pathological conditions. Patients that use DFZ present significantly reduction of bone- and muscle-loss, maintaining cholesterol and diabetogenic normal level when compare to other corticosteroids. Despite its wide use in the therapeutic, there are not pharmacopeia monographs describing methods to quantify DFZ in suspension, and there is insufficient information about stability of this compound. The objectives of this work were: to develop, to improve and to validate method to quantitative and qualitative analysis of DFZ and DFZ on suspension; to evaluate the stability of DFZ; to isolate and to identify the main DFZ degradation product; to evaluate the anti-inflammatory effect and to develop oral suspension containing DFZ. To characterize DFZ we have used thermal analysis, spectroscopic and chromatographic methods. DFZ was characterized with purity 98.98 %. Spectrophotometric and HPLC methods were developed and validated to quantify DFZ in suspension. The best methods to quality control of DFZ in oral suspension were UV and CLAE. Stability studies were performed in acid (HCl 0.1N), alkaline (NaOH 0.1N) and pharmaceutical co-solvents (acetate and phosphate buffer, glycerin, sorbitol and PEG-400). In the stability studies, we have shown that DFZ degraded faster in alkaline medium. In acetate buffer (pH 5.0) plus PEG-400, DFZ has minor degradation. The main degradation product of DFZ (DDP1) was isolated from hydrolyze in alkaline medium and it was identified by mean of spectroscopic methods and was identify like 21-hydroxydeflazacort. DDP1 was tested in compare to DFZ in animal *in vivo* and *in vitro* assays. In the pharmacologic assays, we have shown that DFZ and its metabolite (21-hydroxydeflazacort) present anti-inflammatory effect *in vivo* e *in vitro*. We have developed and evaluated to accelerated stability four suspension containing Deflazacort. The formulation F1 and F2 containing sodium carboxymethylcellulose were stables and the formulations F3 and F4 containing hydroxymethylcellulose were unstable during the accelerated stability. Our results shown that DFZ was identified by mean of thermal analysis, spectroscopic, UV and CLAE methods and can use like chemical reference substance. The methods were validated for oral suspension. Chemical stability of DFZ in aqueous medium is pH-dependent and the use of pharmaceutical co-solvents influence on DFZ degradation. DDP1, 21-hydroxydeflazacort present more anti-inflammatory effect *in vivo* and *in vitro* than DFZ. Formulation F1 was considered more stable because it maintaining all parameters on 5% limit, corresponding to 24 months of validate. Our results can contribute to establishment of analytical methods to control quality of pharmaceutical formulations containing DFZ in suspension.

Key words: Deflazacort, 21-hydroxydeflazacort, anti-inflammatory, oral suspension, stability.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	16
Objetivos	19
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
Capítulo 1	
1. Revisão bibliográfica	21
1.1. Glicocorticóides	22
1.2. Deflazacorte	24
1.3. Métodos de determinação do deflazacorte.....	25
1.4. Validação de métodos analíticos.....	27
1.5. Estudos de estabilidade do deflazacorte	27
1.6. Desenvolvimento de formas farmacêuticas.....	28
1.7. Suspensão Farmacêutica.....	30
1.8. Estabilidade de medicamentos.....	34
Capítulo 2	
1. Caracterização da substância química referência.....	38
1.1. Introdução	39

1.2. Técnicas termoanalíticas.....	39
1.2.1. Termogravimetria (TG).....	39
1.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	40
1.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H (RMN ¹ H) e de ¹³ C (RMN ¹³ C)	41
1.4. Espectrometria de Massa (MS)	44
1.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	45
1.6. Espectrofotometria na região do Ultra-violeta (UV/UV-vis)	46
1.7. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
2. Conclusão	48

Capítulo 3

Validação da Metodologia	49
Apresentação	50
Artigo1 : Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms	51

Capítulo 4

Estudos de estabilidade do deflazacorte: identificação do produto de degradação e avaliação da atividade antiinflamatória.....	67
Apresentação	68

Artigo 2 : Stability studies of Deflazacort: Identification of degradation product and evaluation of anti-inflammatory effect.....	69
--	----

Capítulo 5

Desenvolvimento, avaliação e estudos de estabilidade de suspensão oral contendo Deflazacorte	88
--	----

Apresentação	89
--------------------	----

Artigo 3 : Desenvolvimento, avaliação e estudos de estabilidade de suspensão oral contendo Deflazacorte	90
---	----

Discussão Geral	114
------------------------------	------------

1. Desenvolvimento e otimização de métodos analíticos	116
---	-----

2. Estudo de estabilidade do Deflazacorte	117
---	-----

3. Desenvolvimento de suspensões contendo deflazacorte.....	122
---	-----

Conclusões	126
-------------------------	------------

Perspectivas	128
---------------------------	------------

Referências	129
--------------------------	------------

Apêndices	138
------------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Estrutura química do Deflazacorte.29

Capítulo 2

Figura 1: Curva TG do DFZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.44

Figura 2: Curva DSC do DFZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.....45

Figura 3: Espectro de RMN ¹H de DFZ SQR obtidos em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd6 como solventes.....46

Figura 4: Espectro de RMN ¹³C de DFZ SQR, obtidos em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd6 como solventes.....47

Figura 5: Espectro de massa do DFZ SQR, utilizando um equipamento ESI-MS/MS Micromass Waters Q-TOF com as seguintes condições: temperatura 100 °C, 300 °C; voltagem capilar +3000 V, cone +40V, gás de nebulização nitrogênio e gás de colisão argônio, com colisão de 30V48

Figura 6: Espectro do DFZ SQR na região do infravermelho, realizado em espectrofotômetro IR, Shimadzu modelo IR Prestige-21, utilizando pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo a amostra na concentração de 1 %..49

Figura 7: Espectro da solução de DFZ SQR: A – análise UV da solução etanólica contendo 12 µg mL⁻¹, B – Análise colorimétrica da solução contendo 8 µg mL⁻¹ após reação de redução com azul de tetrazólio em meio alcalino.50

Figura 8: Cromatograma do DFZ SQR na concentração de 30 µg/mL obtido nas seguintes condições: coluna C₁₈, fase móvel acetonitrila:água (80:20 V/V), fluxo 1 ml min⁻¹, detecção UV 240 nm.....51

Capítulo 3

Figura 1: Chemical structure of deflazacort.....56

Figura 2: A – UV spectrum of deflazacort reference standard solution in ethanol (12 µg mL⁻¹). B – Spectrum of the product of the redox reaction of tetrazolium blue and DFZ (8 µg mL⁻¹) used in the colorimetric analysis58

Figura 3: HPLC chromatogram of DFZ obtained from oral suspension 30 µg mL⁻¹ RP₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) column, mobile phase consisted of acetonitrile: water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injection volume was 20 µL and elution of peaks was monitored at 244 nm58

Capítulo 4

Figura 1: Chemical structure of DFZ (DFZ) (A) and its degradation product- DDP1: 21-hydroxydeflazacort (B)73

Figura 2: Chromatograms showing decomposition of DFZ in alkali-induced degradation product (NaOH 0.1N), time zero (A); in acid-induced degradation product (HCl 0.1N) - time zero (B) and 24 hours (C)81

Figura 3: Effects of DFZ (DFZ) (A) or DFZ Degradation Product 1 (DDP1) (B) (1 or 10 mg/kg) or saline on paw oedema model induced by carrageenan. Each value represents the mean ± S.E.M. of 6 animals, and asterisks indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups, *P* < 0.0584

Figura 4: Effects of the administration (i.p.) of DFZ (DFZ) (1mg/Kg) or DFZ Degradation Product 1 (0.1, 1, or 10 mg/kg, i.p.) on acute carragenan-induced inflammatory reactions, measured by the concentration of cells in the peritoneal fluid (peritonitis). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks indicate significant inhibition of the total number of cells in the peritoneal cavity in relation to the untreated groups, $P < 0.05$ 85

Figura 5: Effects of treatment with DFZ (DFZ) (A) or DFZ Degradation Product 1 (DPP1) (B) (1, 10, or 100 μ g/mL) on nitrite production by RAW 264.7 cells stimulated with 1 μ g/ml LPS for 20 h, or on respectively cell viability by MTT assay (b). Bars represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate and asterisks indicate significant inhibition of enzyme activity in relation to the untreated group, $P < 0.05$ 86

Capítulo 5

Figura 1: Estrutura química do Deflazacorte 95

Figura 2: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão acetato nos pHs 4,48, 5,00 e 5,40 avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP) e avaliados através de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$) 102

Figura 3: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão fosfato no pHs 6,80 avaliado nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP) 102

Figura 4: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão acetato no pH 5,00 associado a sorbitol, glicerina ou PEG-400 avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP) e avaliados através de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$) 103

Figura 5: Volume de sedimentação das formulações F1, F2, F3 e F4 108

Figura 6: Redispersibilidade das formulações F1, F2, F3 e F4 durante o ensaio de estabilidade acelerada	110
Figura 7: Determinação do teor de princípio ativo das formulações F1, F2, F3 e F4 no ensaio de estabilidade acelerada.....	110
Figura 8: Perfil cromatográfico das formulações F1 (A), F2 (B), F3 (C) e F4 (D) após 180 dias de estabilidade acelerada.	111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Deslocamentos químicos dos hidrogênios do Deflazacorte 59

Tabela 2: Deslocamentos químicos dos carbonos do Deflazacorte 60

Capítulo 3

Tabela 1: Overview of the linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) data obtained for deflazacort by the chromatographic and spectrophotometric methods 59

Tabela 2: Precision of the evaluated methods for deflazacort determination 60

Tabela 3: Accuracy of the evaluated methods for deflazacort determination 61

Tabela 4: Results from study of CLAE robustness for deflazacort determination..... 61

Capítulo 5

Tabela 1: Concentração das substâncias utilizadas no desenvolvimento da suspensão. 98

Tabela 2: Composição das formulações F1, F2, F3 e F4 utilizadas para o ensaio de estabilidade acelerada 106

Tabela 3: Caracterização das suspensões desenvolvidas: pH, redispersibilidade, determinação teor 107

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Os glicocorticóides (GC) apresentam atividade antiinflamatória e imunossupressora potente sendo utilizados na terapêutica de várias patologias. Devido aos efeitos adversos causados pelos glicocorticóides como osteoporose, indução do diabetes, hipertensão, cataratas, perda de massa muscular, novos fármacos foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir estes efeitos indesejáveis e melhorar o efeito terapêutico (BOLING, 2004; COHEN e ADACHI, 2004; CRAIG e SITZEL, 2005).

O Deflazacorte (DFZ) é um glicocorticóide derivado da prednisolona indicado no tratamento de doenças reumáticas, dermatológicas, alérgicas, respiratórias, do tecido conjuntivo, gastrointestinais, transplante de órgão entre outras. Comparado à prednisona, em doses equivalentes, este fármaco apresenta a vantagem da redução significativamente menor na perda óssea, manutenção dos níveis de colesterol, menor efeito diabetogênico e menor perda de massa muscular. É um fármaco importante, quando comparado a outros glicocorticóides, para pacientes que apresentam problemas crônicos, como distrofia muscular progressiva e transplante de órgãos e que precisam de tratamento por longo período de tempo, devido aos seus reduzidos efeitos adversos (LIPPUNER et al., 1998; FERRARIS et al., 2007).

Atualmente o DFZ é comercializado na forma de comprimidos (de 6 e 30 mg), e, alternativamente, pode ser manipulado na forma de cápsulas ou na forma líquida, com concentrações variando de 7,5 a 30 mg, conforme prescrição médica. Até o início de 2007 a suspensão farmacêutica era encontrada como medicamento referência, genérico e similar (ANVISA, 2009). No entanto, por motivos não esclarecidos, a mesma foi retirada do mercado. A formulação líquida é uma opção terapêutica para adequação da dose, uso em crianças e em pacientes que não conseguem engolir comprimidos.

Até o momento não existem monografias farmacopéicas para o DFZ, havendo poucos métodos descritos na literatura para quantificação deste fármaco em cápsulas e comprimidos (CORRÊA et al., 2007; OSKAN et al., 2003). Em relação à estabilidade do fármaco, as informações disponíveis são escassas sendo que Cuffini et al. (2007) realizaram a caracterização físico-química do DFZ e avaliaram a

estabilidade do fármaco no estado sólido, frente à luz, umidade e temperatura. Correa e colaboradores (2007) realizaram estudo de degradação estresse do fármaco, com intuito de desenvolvimento de método de análise, tendo sido observada a formação de produtos de degradação, os quais não tiveram sua estrutura elucidada.

Considerando o exposto, este trabalho contemplou o desenvolvimento, otimização e validação de método para análise qualitativa e quantitativa em suspensão oral e comprimidos. Também foram realizados estudos de estabilidade do fármaco, com o objetivo de isolar, identificar e realizar estudos de avaliação da atividade farmacológica comparativa *in vivo* e *in vitro*. Complementando os estudos, foi desenvolvida uma suspensão oral contendo o fármaco.

A apresentação deste trabalho está disposta na forma de 5 capítulos sucessivos; revisão bibliográfica; caracterização da substância química referência, artigo científico (1) intitulado: "Spectrophotometric and HPLC determination of Deflazacort in pharmaceutical dosage forms"; artigo científico 2, intitulado: "Stability studies of Deflazacort: Identification of degradation product and evaluation of its anti-inflammatory effect", e artigo científico 3 intitulado "Desenvolvimento, avaliação e estudos de estabilidade de suspensão oral contendo Deflazacorte". Para finalizar o trabalho foi realizada uma discussão geral em função de todos os resultados obtidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos para controle qualitativo, quantitativo; estudar a estabilidade e desenvolver uma suspensão oral contendo DFZ.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do fármaco: DFZ.
- Otimizar método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa em suspensão oral e estudos de estabilidade do DFZ;
- Otimizar método por espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível para determinação quantitativa do DFZ;
- Avaliar a estabilidade do fármaco sob condições de hidrólise ácida, alcalina e em solventes farmacêuticos.
- Isolar e identificar o principal produto de degradação formado no estudo de estabilidade.
- Avaliar a atividade farmacológica do DFZ e do produto de degradação.
- Desenvolver uma suspensão oral contendo DFZ.
- Avaliar a estabilidade da suspensão oral desenvolvida.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. GLICOCORTICÓIDES

Os esteróides são hormônios secretados pela córtex supra-renal e estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, como a proliferação celular, diferenciação, apoptose e metabolismo (LÖWENBERG et al., 2007). São divididos em duas classes: corticosteróides (glicocorticóides e mineralocorticóides) e os androgênios (FUCHS, WANNMACHER, FERRREIRA, 2004; GENNARO, 2004; RANG, DALE, RITTER, 2001). Em meados do século XIX foi demonstrado que estes eram essenciais à vida. Foram isolados diversos ativos esteróides, mas foi somente entre as décadas de 30 e 50, do século XX, que suas estruturas químicas foram elucidadas e o seu potencial valor terapêutico foi descoberto com o uso da cortisona no tratamento da artrite reumatóide (TRIPHATI, 2006).

Na década de 1950, as modificações da estrutura do cortisol resultaram em novos fármacos, como a prednisona e a prednisolona. Assim, as subseqüentes modificações estruturais dos esteróides sintéticos ampliaram a duração e a potência do efeito glicocorticóide, bem como propiciaram diferentes afinidades e tempo de ligação ao receptor glicocorticóide (GR) (LONGUI, 2007).

Os GC são hormônios sintéticos, baseados na estrutura da molécula de esteróide e, atualmente, são os mais potentes agentes antiinflamatórios e imunossupressores conhecidos, sendo utilizados no tratamento de doenças reumáticas, auto-imunes, respiratórias, renais, gastrintestinais e hepáticas, neurológicas, dermatológicas, alérgicas, gestacionais e em transplantes de órgãos, entre outras (BOLING, 2004; COHEN, ADACHI, 2004; CRAIG, SITZEL, 2005). São rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal, podendo também ser absorvidos pelas vias tópica, retal e inalatória. São rapidamente distribuídos em todos os tecidos e atravessam a placenta em grau variável. Na circulação, ligam-se às proteínas plasmáticas, principalmente globulina. São metabolizados, principalmente, no fígado, mas também em outros tecidos e são excretados através da urina (SWEETMAN, 2007).

Os GC são esteróides lipofílicos, com biodisponibilidade entre 60 e 100% quando administrados por via oral. Muitos são ésteres succinatos ou fosfatos, que levam entre 5 e 30 min após injeção intravenosa para conversão em sua forma ativa (LONGUI, 2007).

O mecanismo de ação ocorre através da imunorregulação genômica ou não-genômica. Na regulação genômica, os glicocorticóides difundem passivamente para dentro da célula e no citoplasma ligam-se a receptores citoplasmáticos solúveis para glicocorticóides, formando um complexo GC-GR, que transloca para dentro do núcleo e faz a regulação gênica. A translocação do complexo para o núcleo possibilita a interação com uma região gênica denominada “elemento de resposta para os receptores de glicocorticóides”. Esta ligação inibe a expressão de fatores de transcrição nuclear pró-inflamatórios como AP-1, NFAT, NF- κ B e STAT ou suprime a transcrição (transrepressão) de genes de proteínas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e IL-2. Além disso, a translocação nuclear do complexo GC-GR pode induzir a transcrição de genes de proteínas imunossupressoras, tais como a proteína inibidora do fator de transcrição nuclear Kappa B (I κ B), anexina-1, Interleucina 10 (IL-10), fosfatase-1 da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK fosfatase-1) e lipocortina-1 (LÖWENBERG et al., 2007).

Recentemente foi descrito que além das ações genômica, os glicocorticóides também podem atuar através de mecanismos não-genômicos. Estes efeitos aparecem rapidamente (minutos), e parecem ser mediados por GR de membrana ou citosólico ou via interação não específica com a membrana celular. Pode ocorrer através de sinais de transdução desencadeados por receptores acoplados à proteínas G, associados a cascatas de segundos mensageiros que podem mobilizar cálcio intracelular (LÖWENBERG et al., 2007).

Apesar do potencial efeito antiinflamatório, muitos efeitos adversos são observados, principalmente, no tratamento de doenças crônicas, limitando, muitas vezes, a efetividade destes fármacos (BOLING, 2004; COHEN, ADACHI, 2004; FUCHS, WAMMACHER, FERREIRA, 2004). Os principais efeitos adversos são: supressão da resposta à infecção ou lesão e cicatrização de feridas; supressão da capacidade do paciente de sintetizar corticosteróides, sendo que a retirada súbita do fármaco pode levar a insuficiência supra-renal aguda e a recuperação poderá levar

de 2 a 18 meses; efeitos metabólicos, atuando sobre metabolismo e equilíbrio hidroeletrolítico, podendo ocasionar a Síndrome de Cushing iatrogênica, em que o paciente fica com face de lua cheia e bochechas vermelhas, tendo aumento de gordura abdominal, equimoses fáceis, cicatrização deficiente de feridas, corcova de búfalo, adelgaçamento da pele, atrofia muscular de braços e pernas. Efeitos menos freqüentes relacionados à dose e tempo de tratamento também podem ocorrer como: hipertensão, hipertensão intracraniana benigna, necrose avascular da cabeça do fêmur, euforia, ocorrendo, às vezes, depressão ou sintomas psicóticos, tendência à hiperglicemia, balanço nitrogenado negativo, aumento do apetite, obesidade e supressão do crescimento em crianças (RANG, DALE, RITTER, 2001, SHÄCKE, DÖCKE, ASADULLAH, 2002). O efeito adverso mais comum e sério é a perda óssea associada ao risco de fraturas, acometendo de 30 a 50% dos pacientes (COHEN, ADACHI, 2004; BOLING, 2004).

1.2. DEFLAZACORTE

O DFZ (Figura 1) é uma metiloxazolina derivada da prednisolona, de nome químico (11 β , 16 β)-21-(acetiloxi)11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dienol [17,16-d] oxazol-3,20-diona; 11b, 21-diidroxi-2-metil-5' β H preгна-1,4-dienol [17-16-d] oxazol-3,20-diona 21 acetato (O'NEIL, 2006). Apresenta fórmula molecular $C_{25}H_{31}NO_6$, com massa molecular de 441,52 e faixa de fusão de 255 – 256,5 °C. Consiste de um pó cristalino branco ou amarelado, solúvel em metanol e etanol. Apresenta um coeficiente de partição (octanol/água) de 1,31 (GALICHET, 2006; SWEETMAN, 2007).

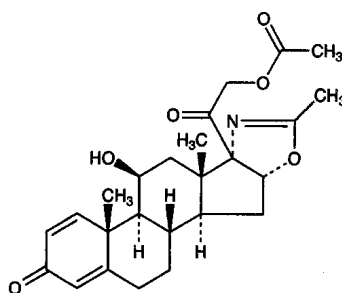


Figura 1 - Estrutura química do Deflazacorte (MARTINDALE, 2007).

De acordo com a Denominação Comum Brasileira DFZ apresenta registro sob número 02728 (ANVISA, 2007).

O DFZ é utilizado para o tratamento da artrite reumatóide, síndrome nefrótica, rejeição de transplantes de órgãos, artrite crônica juvenil entre outras (LÖWENBERG et al., 2007). Tem demonstrado menos efeitos adversos quando comparado a prednisolona ou outros corticosteróides (LIPPUNER et al., 1998, ANGELINI, 2007; FERRARIS, et al., 2007). Estudos demonstraram que o DFZ apresenta menor efeito sobre metabolismo de glicídios e lipídios. Estudo clínico do efeito de DFZ versus prednisona em crianças transplantadas demonstrou menor acúmulo de massa de gordura, redução do aumento dos triglicerídeos e colesterol e prevenção de perda óssea (LIPPUNER et al., 1998). Estudo clínico usando DFZ e metilprednisolona em crianças transplantadas demonstrou, após 2 a 3 anos de tratamento, o aumento da massa muscular magra, redução da massa gorda, crescimento linear, impediu a excessiva perda óssea, promoveu aumento de HDL, redução de LDL e colesterol total nos pacientes tratados com DFZ, quando comparados com os pacientes tratados com metilprednisolona (FERRARIS et al., 1998; FERRARIS et al., 2007). Estudo clínico em pacientes com distrofia muscular progressiva avaliou os benefícios do tratamento com DFZ em crianças e durante a segunda década de vida (BIGGAR et al., 2004; BIGGAR et al., 2006). Os maiores benefícios com uso diário foram a melhora das funções motora, cardíaca e pulmonar, a diminuição da necessidade de instrumentação da coluna vertebral e a possibilidade do paciente poder alimentar-se sozinho por um período de tempo maior (BIGGAR et al., 2006).

1.3. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO DFZ

Não existe método oficial para determinar DFZ em matéria-prima e formas farmacêuticas e poucos métodos foram encontrados na literatura para análise desse fármaco nas formas disponíveis. Em fluidos biológicos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada por alguns autores; Bernareggi e colaboradores (1987) realizaram a determinação simultânea de dois metabólitos do DFZ em plasma humano, utilizando CLAE e detector ultravioleta. Santos-Montes e colaboradores (1994) realizaram a extração e separação por CLAE do DFZ e seu

metabólito 21-hidroxideflazacorte em amostras de urina, usando dois sistemas cromatográficos: Método A) fase móvel: água:tetraidrofurano (80:20, V/V), fluxo 1,2 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, coluna: Spherisorb 5- ODS, a uma temperatura 20 °C e detecção em UV a 245 nm; Método B) fase móvel: água:tetraidrofurano (77:23, V/V), fluxo: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção 20 µL, coluna: Hypersil 5-ODS, temperatura 30 °C e detecção em UV a 245 nm. Santos-Montes e colaboradores (1999), utilizando cromatografia líquida micelar, separaram mistura complexa de corticóides naturais e sintéticos. As condições utilizadas foram: fase móvel dodecil sulfato de sódio com butanol, acetonitrila e tetraidrofurano, fluxo: 0,5 mL min⁻¹, coluna C₁₈ Hypersil, temperatura de 30 – 60 °C e detecção a 245 nm. Ozkan e colaboradores (2003) realizaram estudos de dissolução de DFZ e determinação deste em comprimidos e soro humano por cromatografia líquida em fase reversa. Na separação foi utilizada uma coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm) e fase móvel constituída de acetonitrila e metanol e tampão fosfato 0,067 M (27:20:53, V/V/V), ajustando o pH 6,5 com NaOH 3M. O volume injetado foi de 20 µL e detecção em 244 nm. Em 2004, Yapar e colaboradores propuseram método por análise de injeção de fluxo com detecção no ultravioleta para determinação de DFZ em comprimidos.

Corrêa et al. (2007) realizaram estudo de controle de qualidade do DFZ abrangendo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliar este fármaco em comprimidos e cápsulas manipuladas. Neste estudo, foram desenvolvidos e validados métodos por CLAE e por espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível. O método por CLAE utilizou coluna C₁₈ (250 x 4.6 mm x 4 µm); fase móvel constituída de acetonitrila e água (80:20, V/V), com fluxo de 1,0 mL min⁻¹; e detecção no UV a 240 nm (CORRÊA et al., 2007). O método por espectrofotometria na região do ultravioleta utilizou etanol como solvente e detecção em 244 nm. O método espectrofotométrico na região do visível foi baseado no método descrito na farmacopéia americana (USP 29, 2005) para determinação de esteróides, por meio de uma reação de redução do fármaco com azul de tetrazólio e hidróxido de tetrametilamônio. A validação dos métodos foi conduzida conforme recomendações do ICH (2005).

1.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O método analítico a ser empregado em análise farmacêutica deve ser validado e o objetivo desta validação é demonstrar que este é adequado ao objetivo proposto (BRASIL, 2003). Segundo a USP 29 (2005) a validação é um processo no qual se estabelece que as características de desempenho do método atendam às exigências para a aplicação analítica pretendida. Este objetivo é alcançado demonstrando que os resultados das características obtidas durante a validação estão dentro dos critérios de aceitação, incluindo o protocolo de validação que tem que ser escrito e aprovado. De acordo com a ISO/IEC 17025 (2005) o laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados os quais foram usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos. Para validação tem sido utilizado o guia “International Conference on Harmonisation” (ICH) que traz procedimentos de validação analítica: texto e metodologia Q2(R1) (GALICHET, 2006; ICH, 2005). O ICH (2005) divide os métodos analíticos em quatro categorias, incluindo os testes de identificação, os testes quantitativos de impurezas, testes para controle do limite de impurezas e os ensaios para determinação quantitativa, para avaliar potência (teor) do fármaco ou para verificação do perfil de dissolução de amostras específicas. As características de validação que precisam ser consideradas são: exatidão, precisão, especificidade, faixa de medição, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez.

A validação de métodos analíticos é parte integral para assegurar a qualidade dos resultados, credenciamento e a publicação (PETERS et al., 2007).

1.5. ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO DFZ

Testes de estresse são utilizados para avaliar a estabilidade do fármaco e a possível formação de produtos de degradação, o que pode ajudar a estabelecer rotas de degradação, a estabilidade intrínseca da molécula e validar o procedimento analítico apropriado. Estes testes podem ser realizados em um lote do fármaco e inclui o efeito da temperatura, umidade, oxidação e fotólise. Também pode ser

avaliado a susceptibilidade do fármaco à hidrólise em solução ou suspensão em uma variação de pH (ICH, 2003).

De acordo com ICH 2006, estudos de estabilidade, conhecimento das rotas de degradação, estudos de desenvolvimento e estudos de laboratório são usados para caracterizar produtos de degradação. Além disso, é importante avaliar a segurança biológica individual de impurezas e produtos de degradação. Estes produtos de degradação estudados devem ser qualificados (ICH, 2006).

A qualificação do produto de degradação consiste nos estudos e avaliação dos dados que estabelecem a segurança individual deste ou estabelece especificações dos níveis permitidos do produto de degradação presente na matéria prima e formulação. Produtos de degradação que são metabólitos encontrados em estudos realizados com animais e/ou estudos humanos são geralmente considerados qualificados (ICH, 2006).

Estudos da estabilidade do DFZ são escassos na literatura. Cuffini et al. (2007) realizaram a caracterização físico-química do DFZ por meio de análise térmica (TG e DSC), análise cristalográfica e análise espectroscópica. Avaliaram, também, a estabilidade do fármaco no estado sólido frente à luz, umidade e temperatura, através de análise térmica e cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados demonstraram que o DFZ manteve a mesma estrutura conformacional tanto no estado sólido, como em meio aquoso, mas apresentou degradação sob luz UV.

Na avaliação da especificidade do método por CLAE proposto por Corrêa et al. (2007) os autores observaram a formação de picos adicionais após refluxo do fármaco por 4 horas a 80 °C em HCl 0,1M e NaOH 0,1M. Nos estudos citados os produtos formados não foram elucidados.

1.6. DESENVOLVIMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica os fármacos precisam ser submetidos a algumas operações farmacêuticas que tem como objetivo a obtenção

de um medicamento adequado a sua finalidade terapêutica e facilidade de administração (PRISTA et al., 2003). O objetivo do desenvolvimento é projetar um produto de qualidade e processo de manufatura para chegar à performance do produto desejado. A informação e o conhecimento adquirido nos estudos de desenvolvimento farmacêutico e a experiência de manufatura auxiliam a compreensão científica das boas normas de fabricação, especificações do produto e controle de processo. Informações dos estudos de desenvolvimento pode ser a base para o gerenciamento dos riscos da qualidade. É importante reconhecer que a qualidade não pode ser testada somente no produto final, esta deve ser construída durante o processo de desenvolvimento. Mudanças na formulação e processo de manufatura durante o desenvolvimento e gerenciamento do ciclo de vida poderiam ser vistos como uma oportunidade para ganhar conhecimento adicional. Resultados inesperados alcançados durante os experimentos também podem ser úteis (ICH, 2005).

O formulador pode escolher conduzir os estudos de desenvolvimento farmacêutico, podendo levar a um aumento do conhecimento da performance do produto em cima de uma ampla gama de características materiais, processando opções e parâmetros de processos (ICH, 2005).

Cada substância apresenta características químicas e físicas que devem ser consideradas antes do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, sendo solubilidade, coeficiente de partição, velocidade de dissolução, forma física e estabilidade. Inicialmente várias formulações do produto devem ser preparadas e examinadas quanto às características desejadas (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

O preparo de uma forma farmacêutica requer o uso de excipientes e co-solventes para um preparo adequado do produto. Há evidências na literatura que os excipientes ou co-solventes utilizados podem interferir na farmacocinética, distribuição e eliminação do fármaco (BUGGINS; DICKINSON; TAYLOR, 2007). Os excipientes também interferem diretamente na estabilidade física e química da formulação, logo deve ser verificada a compatibilidade do fármaco com os excipientes escolhidos, os quais são componentes importantes nas formulações podendo melhorar estabilidade, aspecto físico, biodisponibilidade ou também podem

reduzir a eficácia e a estabilidade (CARSTENSEN e RHODES, 2000; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

1.7. SUSPENSÃO FARMACÊUTICA

Os líquidos de administração oral normalmente são soluções, suspensões ou emulsões que contêm um ou mais fármacos em um veículo apropriado (VILA JATO, 1997).

A suspensão consiste de um sistema de duas fases, onde um sólido está disperso em outro sólido, líquido ou gás. Preparações contendo partículas com tamanho de 1 μ m ou superior são definidas farmacêuticamente como suspensões (GENNARO, 2004; ATTWOOD, 2005; USP 2007).

As suspensões têm várias aplicações em farmácia, como a opção de uma formulação líquida para o paciente, sendo usadas principalmente em formas farmacêuticas de uso oral, intramuscular ou subcutâneo (GENNARO, 2004). Também podem ser utilizadas em transdérmicos e produtos de uso tópico (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

As vantagens das suspensões são: ajuste de dose para suprir as necessidades do paciente, ser administrada a crianças e a pessoas incapazes de engolirem formas farmacêuticas sólidas (GENNARO, 2004).

Outra vantagem é a estabilidade do fármaco. Para fármacos insolúveis ou pouco solúveis uma suspensão pode ser a forma farmacêutica adequada. Para fármacos instáveis em meio aquoso, uma forma diferente do fármaco, como um éster ou um sal insolúvel em água pode ser usado no preparo de uma suspensão, melhorando assim a estabilidade (GENNARO, 2004).

As suspensões constituem um importante grupo de formas farmacêuticas, mas também apresentam muitos desafios do ponto de vista de formulação e estabilidade físico-química (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

As principais propriedades físicas desejáveis numa suspensão farmacêutica são: sedimentação lenta, redispersão com agitação do frasco, tamanho de partícula

constante por longo período de tempo, viscosidade adequada, o que facilita a remoção da dose do frasco (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; AULTON, 2005; GALLARDO et al., 2005; PAWLIK, 2005; SINGH et al., 2005; TKACHENKO^{a,b} et al., 2006).

O controle microbiológico também é importante, devido ao grande percentual de água presente na suspensão (USP, 2007).

O processo de dispersão cria um aumento de área interfacial entre as partículas e o meio de dispersão. Quando se consideram as propriedades interfaciais das partículas dispersas dois fatores devem ser levados em consideração: a redução do tamanho de partícula, que produz um aumento da energia livre de superfície, e a presença de carga elétrica na superfície da partícula. Para uma redução da energia livre de superfície ocorre o aglomeramento das partículas (GENNARO, 2004).

A estabilidade da suspensão é dada pelas forças que governam o sistema. Em um sistema completamente defloculado as partículas não estão associadas; a pressão sobre cada partícula pode levar a um empacotamento tão compacto que as energias de barreira não suportam e as partículas ligam-se irreversivelmente. Neste sistema as forças repulsivas predominam as partículas e estas permanecem como unidades separadas, a sedimentação é lenta, podendo levar ao fenômeno de caking, onde o sedimento formado é compacto e difícil de redispersar, (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; GALLARDO et al., 2005; VILA JATO, 1997).

Em sistemas floculados as partículas sedimentam como flocos e não como partículas individuais. A agregação das partículas se dá através de ligações fracas de Van der Waals e conduzirá a uma sedimentação mais rápida onde o sedimento é poroso, volumoso e fácil de redispersar, com menor tendência a compactação (GALLARDO et al., 2005). As desvantagens dos sistemas floculados são a aparência e a necessidade de uma redispersão mediante agitação para assegurar a dose (VILA JATO, 1997).

Uma formulação defloculada pode ser induzida à floculação através da adição de um agente floculador, como os eletrólitos, polímeros e agentes tensoativos. O

objetivo é controlar a floculação para que resulte em um volume de sedimentação máximo (GENNARO, 2004).

Após a incorporação do agente floculante adequado, é necessário determinar se a suspensão é floculada ou defloculada, o que depende da magnitude das forças de repulsão e atração entre as partículas. A maioria das partículas sólidas, num meio líquido, adquire uma carga elétrica de superfície proveniente da adsorção de íons do meio ou da perda de cargas iônicas, ou então os grupos funcionais na superfície da partícula podem ser ionizados em contato com a água (ADAMCZYK, 2002; TKACHENKO et al., 2006).

O controle do grau de floculação de um sistema pode ser realizado através da evolução do volume de sedimentação, do potencial zeta e da redispersibilidade do sistema (ATTWOOD, 2005).

As suspensões podem apresentar uma série de problemas relativos à formulação. Para a obtenção de uma suspensão é necessário uma molhabilidade adequada da partícula sólida, ou seja, remoção do ar que está em contato com o sólido, e localização do líquido em torno da partícula. Se isto não ocorre, a dispersão fica dificultada. Alguns fármacos insolúveis em água são facilmente umectados, enquanto fármacos mais hidrofóbicos são mais difíceis, dificultando a dispersão. Quando isto ocorre não há o deslocamento do ar em torno das partículas e estas tendem a flutuar, aderir-se a parte superior do recipiente ou aglomerar-se entre si (VILA JATO, 1997).

Quando o fármaco é muito hidrofóbico torna-se necessário o uso de tensoativos, polímeros hidrofílicos e co-solventes (VILA JATO, 1997).

A inclusão de agente tensoativo é útil na prevenção da formação de barreira hidrofóbica formada em contato com a água, aglomeração ou re-cristalização das partículas do fármaco após a dispersão (POUTON, 2006).

Os agentes tensoativos atuam reduzindo a tensão interfacial sólido-líquido. São utilizados em baixas concentrações e em concentrações maiores tem como desvantagem a excessiva formação de espuma, sabor ruim, odor desagradável e formação de sistema defloculado. Também podem ser utilizados para diminuir a adesão das partículas na superfície do frasco (VILA JATO, 1997; GENNARO, 2004).

Os polímeros hidrofílicos atuam como veículo estruturado, formando capas multimoleculares ao redor da partícula hidrofóbica, tornando esta mais hidrofílica. Por outro lado, dependendo do tipo de polímero e da concentração podem aumentar a viscosidade do sistema, diminuindo a velocidade de sedimentação das partículas dispersas (AULTON, 2005).

Os polímeros derivados de celulose são os mais utilizados na indústria farmacêutica como agentes suspensores, aumentando a viscosidade do meio, podendo ser encontrados na forma aniônica, catiônica ou não-iônica (DURO et al., 1998). A celulose, devido a sua natureza altamente cristalina não é solúvel em água. A solubilidade pode ser alcançada mediante modificações químicas para obtenção de polímeros mais solúveis, contendo estrutura hidrofílica e hidrofóbica, dentre eles a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) (MEZDOUR et al., 2007; PEREZ et al., 2008).

A HPMC é um polímero não-iônico solúvel em água, diminui a tensão superficial, formando uma solução coloidal viscosa estável em pH de 3,0 a 11,0 e inibe a cristalização de fármacos causada por variações na temperatura (RAGHAVAN et al., 2003; YASUEDA et al., 2004). A redução da tensão superficial é devida a um aumento do número de segmentos do polímero adsorvidos na interface do meio, causado por uma mudança da conformação molecular das macromoléculas em solução (ARBOLEYA e WILDE, 2005).

A CMC-Na é um polieletrólito aniônico utilizada em soluções orais na faixa de 0,1 a 1%, produzindo soluções claras, tanto em água quente quanto em fria e mantendo-se estável em pH de 2,0 a 10,0 (AULTON, 2005; KIBBE, 2000). A sua principal característica é que possui alta viscosidade em baixas concentrações (YANG; ZHU, 2007). A cadeia conformacional da CMC-Na em solução apresenta conformação helicoidal, o que influencia no seu comportamento reológico (CANCELA et al., 2005; YASAR, TOGRUL, ARSLON, 2007). Pode ionizar em solução aquosa, podendo agir simultaneamente por meio de efeitos eletrostáticos e estéricos (ATTWOOD, 2005; FALKIEWICZ, 1996; KIBBE, 2000).

O aumento da viscosidade da fase externa de uma suspensão, causado pelos agentes poliméricos, reduz a frequência de colisões entre as partículas, conseqüentemente, melhorando a sua estabilidade (GALLARDO et al., 2005).

Os co-solventes são conhecidos pela sua capacidade solubilizante para fármacos pouco solúveis em água (ZHAO; LI, 2007). Os co-solventes miscíveis com água reduzem a tensão superficial, favorecendo a umectação do fármaco. Os principais co-solventes utilizados são: álcool, glicerina e os glicóis (VILA JATO, 1997; ZHAO; LI 2007).

Na prática as formulações contêm uma mistura de polímeros, co-solventes e tensoativos. As proporções destes componentes determinarão como o fármaco sedimentará, e isto pode ser muito sensível a pequenas modificações nas concentrações (POUTON, 2006). O tipo e as quantidades dos excipientes utilizados devem ser averiguados empiricamente de acordo com a formulação desejada, viscosidade e com o fármaco a ser veiculado (VOIGT, 1982).

1.8. ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

A estabilidade de uma forma farmacêutica pode ser definida como a capacidade de uma formulação em uma determinada embalagem de manter as suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. Muitos fatores podem afetar a estabilidade de um medicamento: estabilidade do ativo, interação entre componentes da formulação, processo fabricação, forma farmacêutica, embalagem e as condições ambientais durante o transporte, armazenamento e manipulação; e o período de tempo entre fabricação e uso (GENNARO, 2004; BRASIL, 2005). De acordo com Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade a avaliação da estabilidade de um medicamento é um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

Geralmente os fármacos são mais estáveis na forma sólida que em meio aquoso sendo importante uma correta estabilização, conservação e um estudo adequado de estabilidade. Certas reações químicas podem ocorrer, podendo haver interação entre componentes da formulação, entre fármaco e embalagem, hidrólise,

oxidação, redução, esterificação, descarboxilação e polimerização. Essas reações químicas podem ser iniciadas ou aceleradas pelos fatores ambientais de temperatura, umidade e luz (GENNARO, 2004). Outros fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, composição devem ser cuidadosamente analisados (BRASIL, 2005).

Classicamente, a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é separada em estabilidade física, química e físico-química. A estabilidade física de uma formulação é importante para o formulador e o paciente, pois o produto farmacêutico deve manter estável a aparência. Alterações físicas como perda de cor, escurecimento, alteração sabor ou odor pode fazer o paciente perder a confiança no produto (GENNARO, 2004).

Em alguns casos, a instabilidade química das formulações farmacêuticas pode ser detectada somente por metodologias específicas, como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde pequenas quantidades de substâncias podem ser detectadas, resultando em uma indicação sensivelmente confiável para estimar a estabilidade de produtos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; GENNARO, 2004). Com os avanços da química analítica, a estabilidade do fármaco está mais comumente associada com a formação de baixos níveis de produtos de degradação do que a perda da potência do fármaco (WATERMAN; ADAMI, 2005).

Os estudos de estabilidade conduzidos em condições de estresse auxiliam na identificação de prováveis produtos formados, estabilidade intrínseca do fármaco, estabelecendo possíveis rotas de degradação (ICH, 2003). O estresse ao qual o produto é submetido inclui variação de temperatura, umidade, oxidação, hidrólise e fotoestabilidade (ICH, 2003). Antes de prever o tempo de estocagem de uma formulação é fundamental determinar a cinética de degradação do fármaco sob condições cuidadosamente controladas. No entanto, a decomposição do fármaco, freqüentemente, não segue esquemas simples de reação. Experimentalmente, pode-se monitorar a velocidade de decomposição do fármaco pelo decréscimo de sua concentração com o tempo, ou alternativamente, pela dosagem do

aparecimento de um dos produtos da decomposição (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

O emprego de metodologia analítica adequada é essencial para identificação e separação dos produtos de degradação formados (SINGH e BAKSHI, 2000).

Os estudos de estabilidade são classificados como estudos acelerados, estudos de acompanhamento ou estudos de longa duração (ICH, 2003; BRASIL, 2005). O Guia Para Realização de Estudos de Estabilidade define três tipos de estudo: (1) Estabilidade acelerada: projetada para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, são usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte; (2) Estabilidade de acompanhamento: realizado para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração; (3) Estabilidade de longa duração: projetada para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

Para cada forma farmacêutica, são recomendadas diferentes condições ambientais para avaliação da estabilidade e diferentes parâmetros a serem avaliados (GENNARO, 2004; BRASIL, 2005). De acordo com a resolução RE nº. 1, as condições ambientais recomendadas estão descritas na Tabela 1. Para suspensões as condições recomendadas para o ensaio de estabilidade de um produto a ser armazenado na temperatura de 15-30 °C são: para embalagem semi-permeável no teste acelerado 40 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR e em embalagem impermeável somente em temperatura de 40 °C. Para o ensaio de longa duração 30 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR para embalagem semi-permeável e com ausência de umidade para embalagem impermeável (BRASIL, 2005).

Tabela 1: Condições ambientais para avaliação da estabilidade acelerada e de longa duração para formas farmacêuticas.

Forma farmacêutica	Condição de armazenamento	Embalagem	Temperatura e umidade Acelerado	Temperatura e umidade Longa duração
Sólido	15 - 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR	30 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR
Sólido	15 - 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2°C	30 °C ± 2 °C
Semi-sólido	15 - 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR	30 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR
Semi-sólido	15 - 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2°C	30 °C ± 2 °C
Líquidos	15 - 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR	30 °C ± 2 °C / 75 % UR ± 5 % UR
Líquidos	15 - 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2°C	30 °C ± 2 °C
Gases	15 - 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2°C	30 °C ± 2 °C
Todas as formas farmacêuticas	2 - 8 °C	Impermeável	25 °C ± 2°C	5 °C ± 3 °C
Todas as formas farmacêuticas	2 - 8 °C	Semi-permeável	25 °C ± 2 °C / 60 % UR ± 5 % UR	5 °C ± 3 °C
Todas as formas farmacêuticas	-20 °C	Todas	-20 °C ± 5 °C	-20 °C ± 5 °C

Os parâmetros que devem ser avaliados para suspensão são: aspecto do produto, teor de substância ativa e método analítico correspondente, quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente, limites microbianos, pH, sedimentação pós-agitação em suspensões e perda de peso em suspensões de base aquosa (BRASIL, 2005).

CAPÍTULO 2 –
CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA REFERÊNCIA

1. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA REFERÊNCIA

1.1. INTRODUÇÃO

Para o controle de qualidade, desenvolvimento e validação de metodologia são necessários o uso de substâncias químicas de referência. De acordo com FDA existem duas categorias de padrões: os compendiais, obtidos de fontes farmacopeicas (USP, Farmacopéia Brasileira) e os não compendiais. Os padrões não compendiais são substâncias químicas com elevado grau de pureza e que devem ser cuidadosamente identificados (SWARTZ; KRULL, 1998).

Considerando que não existe padrão compendial para o DFZ, foi utilizada como substância química de referência, neste trabalho, DFZ adquirido da Pharma Nostra, com teor declarado de 99,76 %, lote do fabricante H1480M, de procedência italiana, que foi caracterizado através das seguintes técnicas: temoanalíticas, espectroscópicas e cromatográficas.

1.2. TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

Análise térmica é uma técnica instrumental disponível em pesquisas farmacêuticas e consiste na medida de propriedades físicas ou químicas de uma substância em função da temperatura e/ou do tempo. As mais empregadas são calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG). Informações importantes podem ser obtidas através destas técnicas. A TG pode fornecer informações como dessolvatação, cinética de decomposição, desidratação, degradação e transição de polimorfos (FORD e TIMMINS, 1989).

1.2.1. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica na qual a variação de perda ou ganho de massa da amostra é determinada em função da temperatura

e/ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma variação controlada de temperatura (FORD; TIMMINS, 1989).

As curvas do DFZ SQR foram obtidas em um equipamento Shimadzu TGA-50, usando cadinhos de platina. Amostras de 5 mg, exatamente pesadas, foram submetidas à temperatura de 25 °C a 700 °C com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). TG/DTG demonstrou estabilidade térmica até 270 °C ($\Delta m = 0.984\%$). A decomposição do fármaco ocorreu em duas etapas, sendo o primeiro evento entre 272-390 °C, com grande perda de massa ($\Delta m = 41,97\%$; DTGpeak = 347,60 °C). Foi observada pequena perda de massa entre 391-700 °C. As curvas de TG são apresentadas na Figura 1.

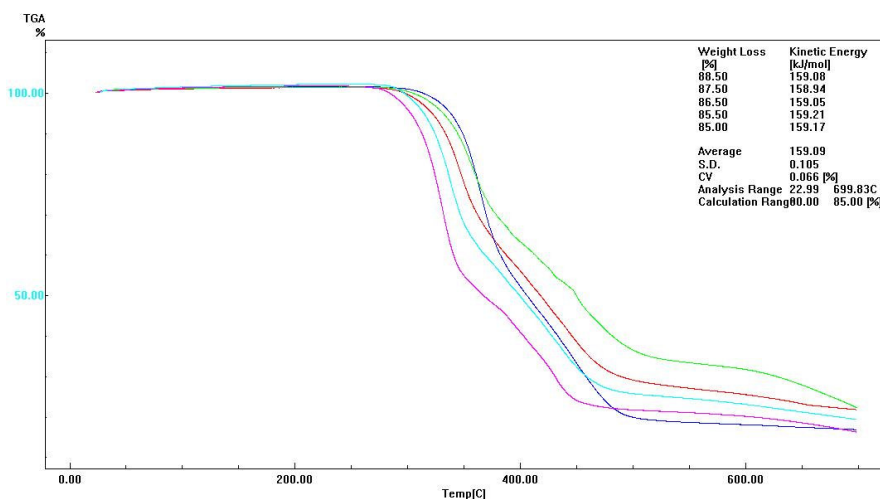


Figura 1: Curva TG do DFZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

1.2.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Este método consiste no aquecimento, em paralelo, de uma amostra e de um padrão de referência inerte, ambos são submetidos a uma mesma razão de aquecimento, registra-se a quantidade de calor necessária para manter o aquecimento. Quando ocorrer uma variação na quantidade de calor fornecida ao sistema em teste (ΔH) é indicado uma transformação térmica na amostra testada (FORD; TIMMINS, 1989; BROWN et al., 1999).

As curvas de DSC foram realizadas usando equipamento DSC-60 calorimeter. Amostras de ~ 2 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min, em uma temperatura de 25 a 500 °C, em atmosfera de nitrogênio. A pureza foi determinada através das curvas baseado na equação de Van't Hoff, usando razão de aquecimento de 2 °C/min.

A curva DSC demonstrou dois eventos térmicos, um endotérmico seguido por outro exotérmico. O primeiro evento refere-se a faixa de fusão (Tonset= 256,58 °C; Tpeak = 256,16 °C; ΔH fusão = -79,18 J/g) e o exotérmico devido ao processo de degradação confirmado pelos dados do TG. O estudo cinético apresentou: E_a = 159,09 KJ/mol, $Z = 3,327 \times 10^{12}/\text{min}$ e $n = 0,5$. O valor de pureza encontrado foi de 98,98 %. A curva DSC está apresentada na Figura 2.

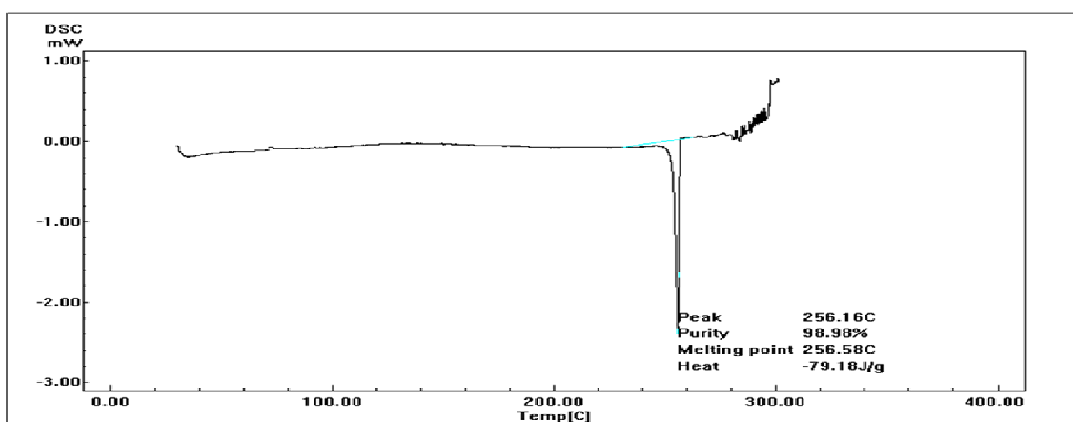


Figura 2: Curva DSC do DFZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

1.3. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear mede a absorção da radiação eletromagnética na região de radiofrequência entre 4 e 750 MHz (MENDHAM, et al., 2002). A ressonância magnética nuclear consiste em submeter um núcleo, cujo spin seja diferente de zero, a um campo magnético e detectar o seu momento magnético, ou sua ressonância magnética. Como cada

núcleo tem um momento diferente, pode-se definir que tipo de ligação química aquele núcleo está realizando (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001).

Esta é uma técnica usada para a caracterização exata da estrutura química. Fornece mais informações sobre a estrutura molecular do que qualquer outra técnica (WATSON, 1999).

As duas técnicas mais importantes e mais utilizadas na caracterização são de RMN de hidrogênios (RMN ^1H) e RMN de carbonos (RMN ^{13}C) (VIPAGUNTA, BRITAIN, GRANT, 2001).

1.3.1. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H (RMN ^1H) E ^{13}C (RMN ^{13}C)

O espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd6 como solventes.

O espectro de hidrogênios está apresentado na Figura 3. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios estão apresentados na Tabela 1. As atribuições foram baseadas nos deslocamentos químicos encontrados em literatura pertinente (SILVERESTEIN, et al., 2005).

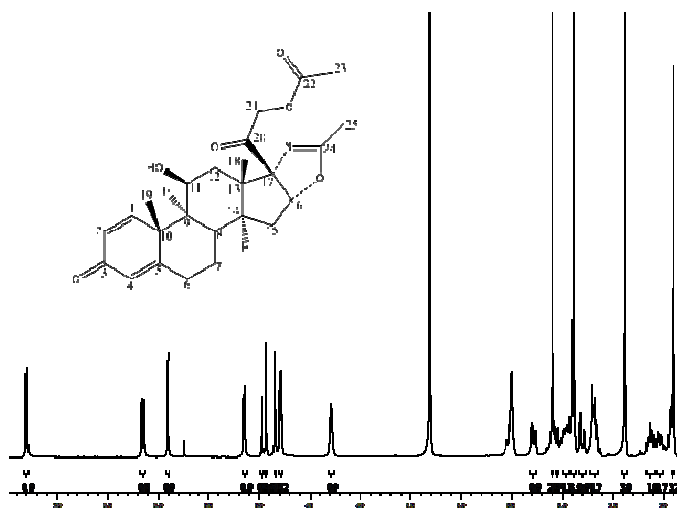


Figura 3: Espectro de RMN ^1H de DFZ SQR obtido em espectrômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd6 como solventes.

Tabela 1: Deslocamentos químicos dos hidrogênios do Deflazacorte.

δ (ppm) multiplicidade	Posição	δ (ppm) multiplicidade	Posição
7,3 (1H, d)	1	2,1 (3H, s)	23
6,2 (1H, d)	2	2,0-2,1 (1H, m)	8
5,9 (1H, s)	4	1,9-2,0 (2H, m)	15
5,1 (1H, m)	16	1,9 (3H, s)	25
4,7-4,9 (2H, dd)	21	1,7-1,9 (2H, m)	12
4,3 (1H, s)	11	1,7 (2H, m)	7
3,3	Metanol	1,4 (3H, s)	19
2,5-2,6 (1H, m)	OH	1,1 (1H, m)	14
2,5	DMSO	0,95 (1H, m)	8
2,3 (2H, m)	6	0,9 (3H, m)	15

O espectro de carbono está apresentado na Figura 4. Os deslocamentos químicos dos carbonos estão apresentados na Tabela 2. As atribuições foram baseadas nos deslocamentos químicos encontrados em literatura pertinente (CUFFINI, et al., 2007).

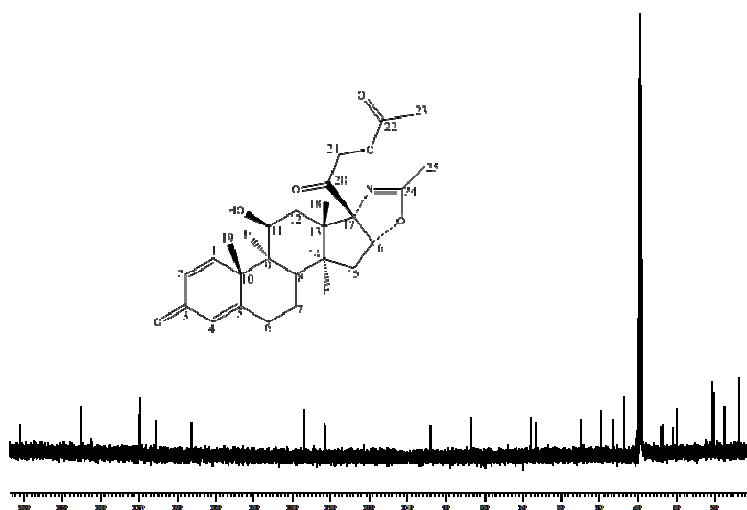


Figura 4: Espectro de RMN ^{13}C de DFZ SQR, obtido em espectrômetro Bruker DPX 400, registrado a 100 MHz, utilizando DMSO/MeOHd6 como solventes.

Tabela 2: Deslocamentos químicos dos Carbonos do deflazacorte.

Deslocamento químico (ppm)	Posição	Deslocamento químico (ppm)	Posição
200.9	20	50	14
185	3	47	13
170	22	43	10
169,5	5	41	12
165	24	34	15
156	1	33.5	7
127	2	31	6
122	4	30	8
94	17	21	19
84	16	20	23
68.5	11	18	18
66	21	14	25
55	9		

1.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS)

A espectrometria de massas é uma técnica versátil e largamente usada na identificação dos elementos presentes em amostras e na determinação de suas concentrações. Apresenta vantagens sobre os métodos de espectrometria óptica tais como limite de detecção e espectros simples (SKOOK, HOLLER, NIEMAN, 2002). Este é um método altamente específico usado para determinar ou confirmar a identidade ou estrutura de fármacos (WATSON, 1999).

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta poderosa disponível para análise de misturas orgânicas ou bioquímicas complexas (SKOOK, HOLLER, NIEMAN, 2002).

DFZ foi avaliado através de espectrometria de massa acoplado a cromatografia líquida. Foi utilizando um equipamento Waters, utilizando coluna C₁₈, fase móvel constituída de água:acetonitrila (60:40, V/V) e 0,1 % ácido fórmico, acoplado ao equipamento Biosystems Q-TRAP, utilizando as seguintes condições:

modo positivo, capilar +5500V, DP + 50, gás de nebulização nitrogênio, temperatura 300°C. Para ESI-MS/MS foi utilizado um equipamento Micromass Waters Q-TOF com as seguintes condições: temperatura 100 °C, 300 °C; voltagem capilar +3000 V, cone +40 V, gás de nebulização nitrogênio e gás de colisão argônio, com colisão de 30 V.

A espectroscopia de massas foi utilizada para confirmar a massa molecular do DFZ SQR. DFZ apresenta massa molecular de 442 e o principal íon molecular obtido na análise foi m/z 442 (=massa 441 + H), conforme espectro apresentado na Figura 5.

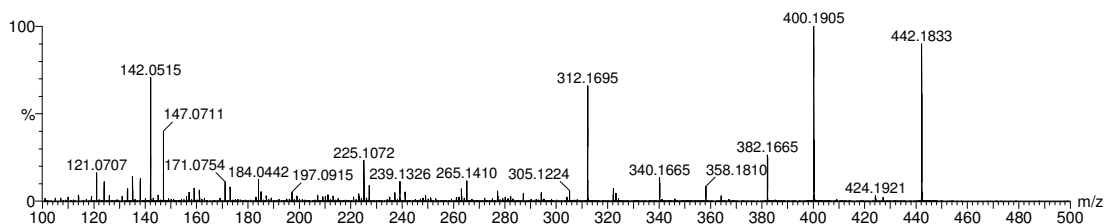


Figura 5: Espectro de massa do DFZ SQR, utilizando equipamento ESI-MS/MS Micromass Waters Q-TOF com as seguintes condições: temperatura 100 °C, 300 °C; voltagem capilar +3000 V, cone +40 V, gás de nebulização nitrogênio e gás de colisão argônio, com colisão de 30 V.

1.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

A espectroscopia em infravermelho baseia-se na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho, mensurando a absorção desta radiação pela molécula em análise. Esta absorção resulta de modificações na energia vibracional da molécula em um determinado momento dipolar, o que permite identificar o tipo de ligação presente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A espectroscopia do infravermelho é utilizada para avaliar a identidade de matérias-primas usadas na produção de medicamentos e na identificação de fármacos. A identificação baseia-se nas bandas de absorção que certos grupos originam na mesma frequência (WATSON, 1999).

Os experimentos de IV foram realizados em espectrofotômetro IR, marca Shimadzu modelo IR Prestige-21. Para as análises foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo a amostra na concentração de 1 %.

O IV do DFZ SQR revelou três bandas na região de 1749 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} , referindo-se aos grupos 22-CO, 20-CO e 3-CO, respectivamente, conforme descrito por Cuffini et al, 2007. O espectro de IV está apresentado na Figura 6.

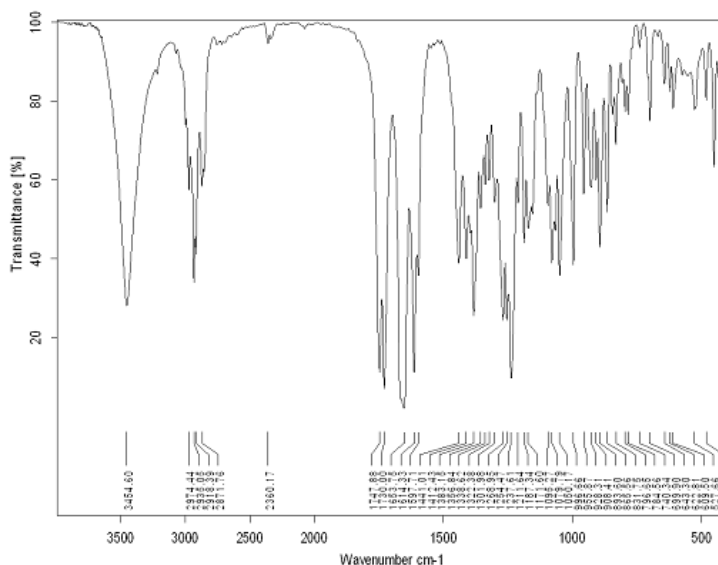


Figura 6: Espectro do DFZ SQR na região do infravermelho, realizado em espectrofotômetro IR, Shimadzu modelo IR Prestige-21, utilizando pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo a amostra na concentração de 1 %.

1.6. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRA-VIOLETA (UV/UV-VIS)

Muitos fármacos absorvem radiação no espectro da região do ultravioleta, no entanto outros que apresentam cor absorvem na região do visível. Os fármacos esteroidais apresentam máximo de absorção em torno de 240 nm (WATSON, 1999).

A solução metanólica de DFZ apresenta absorção máxima em 242 nm (O'NEIL, 2006). Conforme apresentado na Figura 7- A, uma solução etanólica de DFZ apresenta máxima absorção em 244 nm.

Métodos colorimétricos são utilizados para determinação de esteróides, através de reação do fármaco com azul de tetrazólio e hidróxido de tetrametilamônio (USP, 2006). Após reação de redução com azul de tetrazólio em meio alcalino, o DFZ demonstrou absorção máxima em 524 nm, conforme apresentado na Figura 7-B.

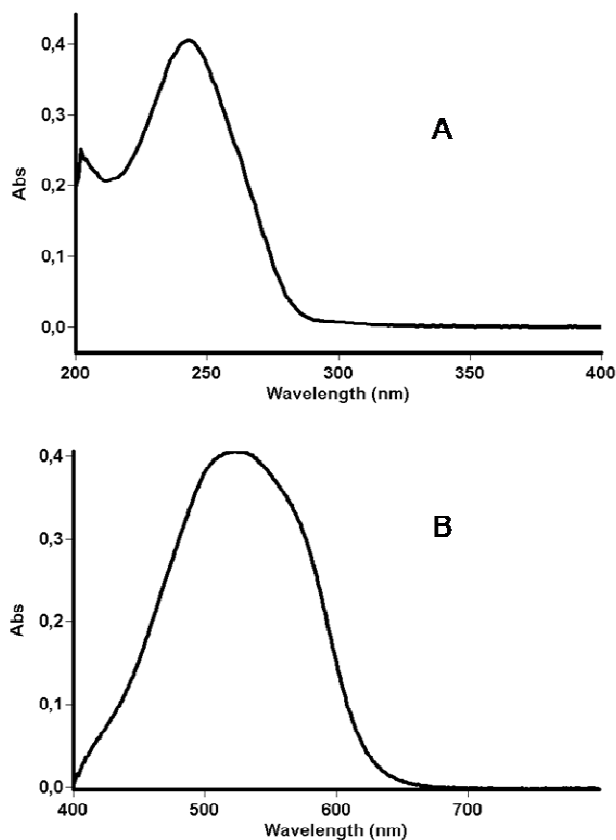


Figura 7: Espectros de absorção de DFZ SQR: A – Análise na região do UV de solução etanólica contendo $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, B – Análise colorimétrica de solução contendo $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, após reação de redução com azul de tetrazólio em meio alcalino.

1.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Em muitos laboratórios analíticos a CLAE tem se tornado uma técnica indispensável para análise de teor e impurezas em amostras (CLAESSENS, VAN STRATEN, 2004). O uso desta técnica para identificação é menos utilizada, visto que é necessário o uso de padrão do fármaco ou este acoplado a espectrometria de massas para confiabilidade dos resultados.

O método utilizado por CLAE foi validado de acordo com manuscrito descrito no capítulo 3. O cromatograma obtido com uma solução de DFZ $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ está apresentado na Figura 8, onde se verifica o aparecimento de um único pico com tempo de retenção de 3,3 minutos.

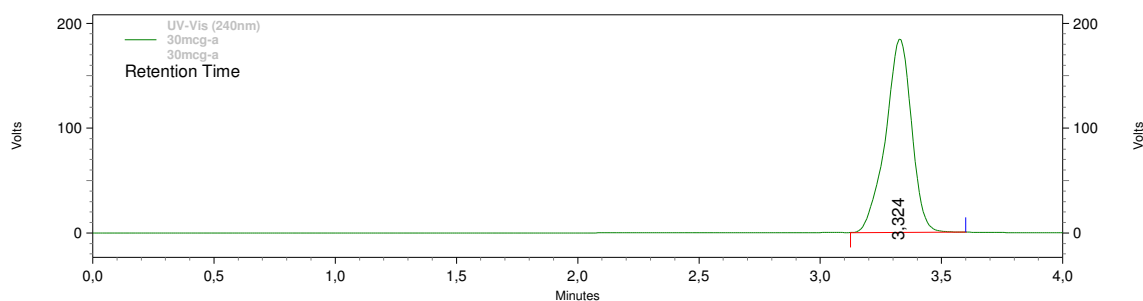


Figura 8: Cromatograma do DFZ SQR na concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtido nas seguintes condições: coluna C_{18} ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 4 \mu\text{m}$); fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção $20 \mu\text{L}$, detecção UV 240 nm.

2. CONCLUSÃO

O DFZ foi devidamente identificado e quantificado através de técnicas confiáveis e adequadas a este fim. Considerando os resultados obtidos, a matéria-prima de DFZ pôde ser utilizada como SQR.

CAPÍTULO 3 – VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes aos estudos de desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de deflazacorte em suspensões farmacêuticas, uma vez que não existem metodologias farmacopéicas e validadas para o controle de qualidade de deflazacorte em suspensão oral.

O desenvolvimento e a validação de métodos espectrofotométricos para quantificação do deflazacorte em suspensão oral foram realizados por serem amplamente utilizados devido à facilidade, rapidez e custo do ensaio, apesar da moderada seletividade.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi validada devido a sua alta seletividade, capacidade de detecção de impurezas e produtos de degradação. Apesar do alto custo e da necessidade de equipamentos mais sofisticados é bastante utilizada na rotina do controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

A validação teve como finalidade demonstrar que os métodos analíticos otimizados são adequados para a determinação do DFZ em suspensão oral. Com o objetivo de avaliar diferença significativa entre os métodos, estes foram comparados entre si, através de análise comparativa de ANOVA.

O referido artigo foi submetido ao Scientia Pharmaceutica.

Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms

Amarilis Scremin¹; Niraldo Paulino³ Monika Piazzon¹; Marcos Antonio Segatto Silva¹; Gislaine Kuminek¹; Giane Márcia Correa²; Simone Gonçalves Cardoso¹.

¹ Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brazil.

² Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Ijuí, RS, Brazil.

³ Universidade Bandeirante de São Paulo, SP, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author.

E-mail address: amarilis_paulino@yahoo.com.br

Fone: 5548-37215066

Fax: 5548-37219350

Abstract

Deflazacort (DFZ) is a corticosteroid currently available as tablets and oral suspension. This study focused on the development and validation of fast, low-cost and selective methods for routine quality control analysis of DFZ in tablets and oral suspension. We compared the detection of DFZ by three methods: a directly read UV spectrophotometric analysis, a colorimetric analysis based on the redox reaction with blue tetrazolium, and a high performance liquid chromatographic (HPLC) method in conjunction with UV detection. The methods were validated according to International Conference on Harmonisation (ICH). The linearity of the methods was good ($r > 0.999$), as were intra-day and inter-day precision (R.S.D. $< 5\%$) and accuracy (recovery $> 97\%$). The results showed that the UV spectrophotometric and HPLC methods were statistically equivalent. However, the values obtained by the colorimetric assay differed significantly from the other methods, making this procedure less satisfactory than the UV spectrophotometric and HPLC methods. Since the UV spectrophotometric and HPLC methods are precise and simple, they may be successfully applied to quality control analysis of DFZ in tablets and oral suspension.

Keywords: Deflazacort . HPLC. UV. Validation. Oral suspension. Tablets.

Introduction

Deflazacort (DFZ) (Fig. 1) is an oxazoline (1-(1,16)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2-methyl-5H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazole-3,20-dione) [1] derivative of prednisolone with anti-inflammatory and immunosuppressive activity [2]. The drug has been prescribed for treatment of rheumatoid arthritis, asthma and others conditions [3-5], and is a corticosteroid with a lower risk of side effects than other available steroids [3,5,6].

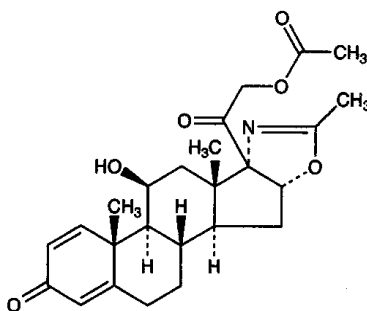


Fig. 1. Chemical structure of deflazacort.

DFZ is currently available as tablets and as an oral suspension. Several high performance liquid chromatographic (HPLC) methods have been reported for determination of DFZ and its metabolites in biological fluids [7-15]. However, there is no official method for DFZ analysis in any of the pharmacopoeia. One report on a reversed-phase liquid chromatographic method with UV detection for determination of DFZ in raw material, in pharmaceuticals, and for *in-vitro* drug-dissolution studies has appeared [16]. The drug has been determined in tablets and compounded capsules by HPLC methods [17], but its determination in an oral suspension has not yet been described. Moreover, no spectrophotometric method is available for the DFZ assay in pharmaceutical formulations. The aim of this study was the

development and validation of rapid, low-cost, and selective methods for routine quality control analyses of tablets and oral suspension formulations containing DFZ.

Results and discussion

The choice of an analytical method depends on factors such as the nature of the drug, the complexity of the sample, and the intended use of the method. For quality control in drug analyses, the simplest and fastest method is desirable. According to Görog, the predominant method for the assay of steroids drugs is reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection [18]. However, spectrophotometric methods are also widely used because they are inexpensive and easy to perform. The spectral investigation of DFZ in different solvents (methanol, ethanol, and acetonitrile) and the influence of excipients present in the pharmaceutical formulations were also evaluated. Due to better drug solubility in ethanol and its lower toxicity, this diluent was chosen for the present analysis. DFZ in ethanol shows an absorption maximum at 244 nm (Fig. 2A). The colorimetric method, which was based on the assay for steroids described in the USP Pharmacopoeia, involves the redox reaction of DFZ with tetrazolium reagent in alkaline medium which generates formazen in a quantitative manner [19]. The optimized time of the redox reaction is 1 hour, and the concentration of DFZ is determined from the absorption at 524 nm (Fig. 2B).

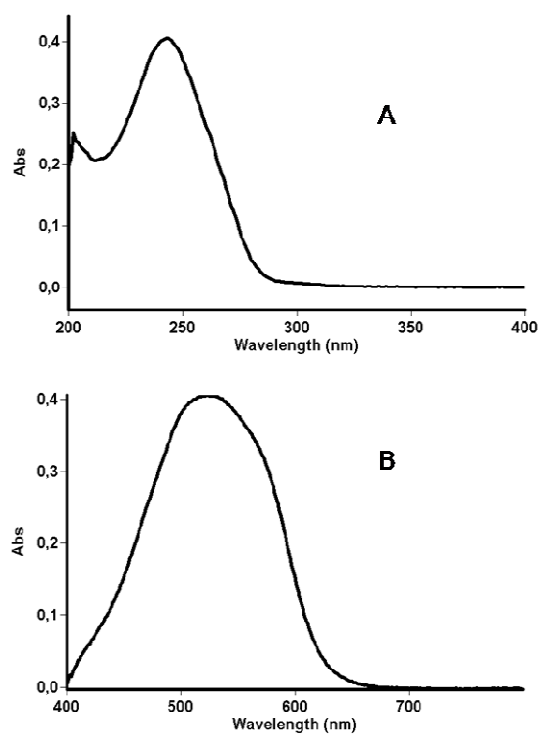


Fig. 2. A – UV spectrum of deflazacort reference standard solution in ethanol ($12 \mu\text{g mL}^{-1}$). B – Spectrum of the product of the redox reaction of tetrazolium blue and DFZ ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) used in the colorimetric analysis.

The HPLC method was previously validated in our group for DFZ assay in tablets and compounded capsules [17]. In the present paper, the HPLC method was extended to the determination of DFZ in oral suspension. A typical chromatogram of DFZ from the oral suspension is shown in Figure 3.

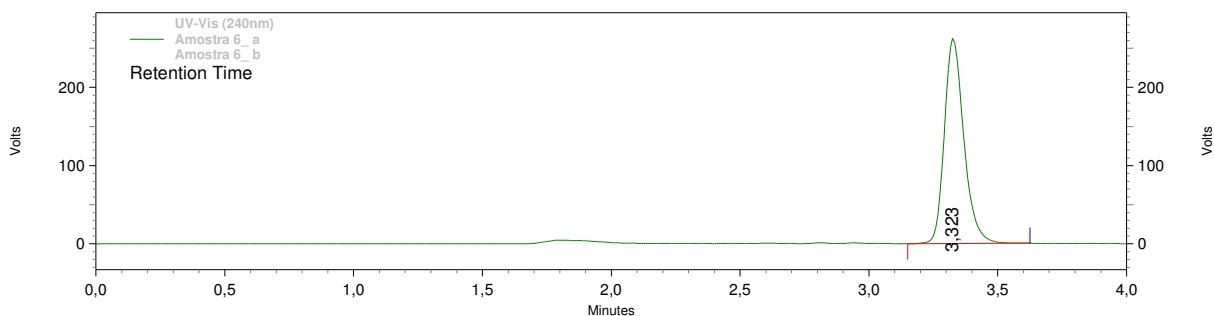


Fig. 3. HPLC chromatogram of DFZ obtained from oral suspension (72 μ g), RP₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 μ m particle size) column, mobile phase consisted of acetonitrile: water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injection volume was 20 μ L and elution of peaks was monitored at 244 nm.

Validation of the methods

We observed no evidence of interferences from the excipients in the methods analyzed. For spectrophotometric methods, the spectra of the samples and the DFZ reference spectrum showed the same maximum. For the HPLC method, the analytic chromatographic peak was not attributable to more than one component (peak purity test > 99%). At equal concentrations, the peak areas of the DFZ standard and solutions of DFZ extracted from the oral suspension were identical. The methods were shown to be selective to quantify DFZ. A linear relationship was found between the DFZ concentrations and the responses (either absorbance intensity or peak area). The linearity data were validated by ANOVA, which demonstrated a significant linear regression and no significant deviation from linearity ($P = 0.05$). The regression analyses are presented in Table 1. High regression coefficients (r) were obtained for all three methods ($r > 0.999$).

Tab. 1. Overview of the linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) data obtained for deflazacort by the chromatographic and spectrophotometric methods.

Method	UV	Colorimetric	LC
Parameters			
Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4 - 24	2 - 16	5 - 50
Regression coefficient (r^2)	0.9990	0.9998	0.9998
Slope \pm standard error	0.0342 ± 0.0004	0.0465 ± 0.0009	41830 ± 376.24
Intercept \pm standard error	0.0063 ± 0.0068	0.0098 ± 0.0085	1577.4 ± 11417
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.12	0.23	0.18
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.37	0.66	0.55

The precision data obtained for the evaluated methods are demonstrated in Table 2.

The R.S.D values show that all the method exhibited good repeatability ($< 5,0\%$) for intra and inter-day precision.

Tab. 2. Precision of the evaluated methods for deflazacort determination.

Method	Oral suspension				Tablets			
	Intra-day		Inter-day		Intra-day		Inter-day	
	% \pm s.e.m.	%RSD	% \pm s.e.m	% RSD	% \pm s.e.m	% RSD	% \pm s.e.m	% RSD
UV	96.3 ± 0.6	2.1	97.9 ± 0.8	1.4	97.2 ± 0.5	1.1	97.2 ± 0.1	0.1
Colorimetric	99.2 ± 1.0	3.5	100.4 ± 1.5	2.6	101.6 ± 0.9	2.0	101.9 ± 0.8	1.3
LC	96.3 ± 0.1	0.4	95.2 ± 0.7	1.2	97.7 ± 0.6	1.5	98.4 ± 0.7	1.2

s.e.m. Standard error mean.

RSD : Relative standard deviation.

Accuracy was investigated by means of a standard addition experiment. Good recovery values were obtained (Table 3) and ranged from 95 to 105 %. The validated spectrophotometric and HPLC methods were applied to the analysis of DFZ in both tablets and oral suspension.

Tab.3. Accuracy of the evaluated methods for deflazacort determination.

	UV			Colorimetric			LC		
Tablets									
Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6.0	12.0	18.0	4.0	8.0	12.0	4.0	8.0	12.0
Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6.06	12.05	18.12	3.85	7.98	12.04	3.98	7.86	11.77
Recovery (%)	101.0	100.7	100.6	97.9	99.8	100.0	99.5	98.2	98.1
Oral suspension									
Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2.0	4.0	8.0	2.0	4.0	6.0	2.5	5.0	7.5
Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.97	3.98	7.85	1.94	3.90	5.90	2.47	5.09	7.54
Recovery (%)	98.7	99.5	98.2	96.9	98.3	98.4	97.4	100.4	98.9

ANOVA tests revealed statistically significant differences among the results obtained by the three individual analytical methods at a confidence level of 0.05. Tukey's multiple comparison test demonstrated that the results obtained by HPLC and UV methods for both tablets and oral suspension were statistically equivalent ($p > 0.05$). However, the values obtained for the colorimetric method differed significantly from those obtained by HPLC and by the UV spectrophotometric methods ($p < 0.05$), and indicated that the colorimetric method was not superior to the UV method based on the natural absorption spectrum of DFZ. The rapid assay times of the UV spectrophotometric method and the good precision for this procedure are additional advantages of this method as compared with the colorimetric method [20]. The HPLC method was more selective, and might be applied successfully for stability studies of DFZ in pharmaceutical formulations.

Robustness is a measure for the susceptibility of a method to small changes that might occur during routine analysis. Deliberate variations in HPLC parameters were made to demonstrate the robustness of the method. We evaluated the method robustness based on the concentration of DFZ. The robustness data obtained for the evaluated method are demonstrated in Table 4. The method demonstrated to be robust.

Tab. 4: Results from study of CLAE robustness for Deflazacort determination

Conditions		% (mean \pm sem) ^a	RSD (%)
Recommended conditions ^b		101,11 \pm 0.26	0,7
Mobile phase,	85:15	102.68 \pm 0,02	0.05
acetonitrile-water	75:25	102.25 \pm 0.13	0.37
	65:35	101.07 \pm 0.03	0.09
λ (nm)	235	102.13 \pm 0.07	0.20
	245	102.46 \pm 0.08	0.21
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.8	102.27 \pm 0.40	1.13
	1.2	102.25 \pm 0.04	0.13

^b Sem is the standard error of the mean

^a The recommended chromatographic conditions were 250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μ m particle size Phenomenex Luna C¹⁸ column with acetonitrile–water 80:20 (v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and UV detection at 240 nm

Experimental

Chemicals and Reagents

DFZ used as reference standard was obtained from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Tablets (30 mg) and oral suspension (22.75 mg mL⁻¹) were purchase at the local market. Water was purified using a Millipore system Milli-Q Gradient. Ethanol, methanol, and acetonitrile were chromatographic grade. All chemicals were analytical grade.

Equipments and conditions

A Varian UV-VIS CARY spectrophotometer and a 10 mm quartz cell was used to obtain all spectral and absorbance measurements. The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10 AD_{VP} pump, a SPD-10AV VP UV-Vis Detector, a SCL-10 A_{VP} system controller, and a degasser module. Data were acquired and processed by Shimadzu CLASS-VP 5.032 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). A RP₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) column was used (Luna Phenomenex). The mobile phase consisted of acetonitrile: water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength was 244 nm.

Preparation of Standard Solutions

Stock solutions (1mg mL⁻¹) for spectrophotometric and HPLC analyses were prepared by dissolving appropriate amounts of DFZ in methanol or acetonitrile, respectively. Aliquots of stock solution were diluted with ethanol (final concentration of 12 µg mL⁻¹ for UV studies) or mobile phase (final concentration of 30 µg mL⁻¹ for LC analyses). For colorimetric analysis, DFZ stock solution was diluted with ethanol to obtain a concentration of 100 µg mL⁻¹. Two mL of this solution (200 µg) was transferred to a 25 mL volumetric flask, then 2 mL of 0.5 % methanolic blue tetrazolium solution and 2 mL of 10 % ethanolic tetramethylammonium hydroxide were added concomitantly. The solution was mixed, and allowed to stand in the dark for 1 hour. After dilution to volume with ethanol (final concentration of 8 µg mL⁻¹), the absorbance was determined, against a blank prepared in a similar mode.

Preparation of sample solution

Samples of crushed tablets or mixed oral suspension (30 mg or 22.75 mg of DFZ, respectively) were placed in 25 mL volumetric flasks. About fifteen mL of either methanol (UV) or acetonitrile (HPLC) was added. The flasks were shaken mechanically for 15 minutes, and diluted to volume with their respective solvents to obtain stock sample solutions. These solutions were filtered through filter paper. For the UV method, the samples were diluted in ethanol to final concentrations of $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for tablets) or $14.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for oral suspension). For the HPLC method, the samples were diluted with mobile phase to give a final concentration of $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for tablets) or $36.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for oral suspension). For the colorimetric assay, the samples were diluted with ethanol to obtain concentrations of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for tablets) or $72.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (for oral suspension). From these solutions, aliquots of 10.0 (tablets) or 2.8 mL (oral suspension) were transferred to a 25 mL volumetric flask, then 2 mL of 0.5 % methanolic blue tetrazolium solution and 2 mL of 10 % ethanolic tetramethylammonium hydroxide were added concomitantly. The solution was mixed, and allowed to stand in the dark for 1 hour. After dilution to volume with ethanol (final concentration of $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ for tablets and $8.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ for oral suspension) the absorbances were determined against a blank prepared in a similar mode. Using an extinction coefficient (ϵ) of 1958, the concentration of DFZ in the samples was calculated.

Method Validation

Each method was validated by the determination of the following operational characteristics: specificity, linearity, precision and accuracy, according to the procedures described in ICH guidelines Q2 (R1) [19, 21].

Specificity

Specificity was assessed by comparing the chromatograms (for HPLC method) or spectra (for spectrophotometric methods) obtained from the drug in a mixture with the most commonly used excipients with those obtained from a blank sample (a solution of excipients in water without drug).

Linearity

Calibrations curves (three different days) were obtained using six concentrations of the DFZ standard solutions over the ranges given in Table 1. The results obtained were used to calculate the equation of the regression line by using the linear least-squares regression method, and the data were also evaluated by analysis of variance (ANOVA).

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

LOD and LOQ were calculated directly from the calibration plot. The LOD and LOQ were calculated as $3.3 r/S$ and $10 r/S$, respectively, where r is the standard deviation of the intercept and S is the slope of the calibration plot.

Precision

The repeatability (intra-day precision) of the procedures was determined by analysis of six samples of tablets or oral suspension, at equal concentrations, during the same day, under identical experimental conditions. Inter-day precision values were obtained by assaying freshly prepared samples of tablets or oral suspension solutions on 3 different days. DFZ contents and the relative standard deviation (R.S.D.) were calculated.

Accuracy

Accuracy was evaluated by the percent recovery obtained from analysis of samples of tablets or oral suspension spiked with known amounts of DFZ reference standard at 3 different levels. The percent recovery was calculated by using the formula proposed by the AOAC [22].

References

- [1] The Merck Index.
2006 an Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merck & CO.,
INC. New York.
- [2] Markham A, Bryson HM.
Deflazacort. A review of its pharmacological properties and therapeutic
efficacy.
Drugs.1995; 50:317–333.
doi:10.2165/00003495-199550020-00008
- [3] Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman BI.
Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular
dystrophy in their second decade.
Neuromuscul Disord. 2006; 16: 249-255.
doi: 10.1016/j.nmd.2006.01.010.
- [4] Angelini C.
The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal.
Muscle Nerve. 2007; 4:424-435.
doi: 10.1002/mus.20812
- [5] Ferraris JR, Pasqualini T, Alonso G, Legal S, Sorroche P, Galich AM, Jasper
H.
Effects of deflazacort vs. Methylprednisone: a randomized study in kidney
transplant patients.
Pediatr Nephrol. 2007; 5:734-741.
doi: 10.1007/s00467-006-0403-0
- [6] Gonzalez-Castañeda RE, Castellanos-Alvarado FA, Flores-Marquez M R,
Gonzalez-Perez O, Luquin S, Garcia-Estrada J, Ramos-Remus C.
Deflazacort induced stronger immunosuppression than expected.
Clin Rheumatol. 2007; 6:935-40.
doi: 10.1007/s10067-006-0223-4.
- [7] Bernareggi I A, Polett P, Zanolò, G, Zerilli, LF.
Simultaneous determination of the two main metabolites of deflazacort in
human plasma by high-performance liquid chromatography.
J Pharm Biomed Anal. 1987; 5:177-181.
doi: 10.1016/0731-7085(87)80021-3
- [8] Santos-Montes A, Gonzalo-Lumbreras R, Gasco-Lopes A I, Isquierdo-
Hornillos R.
Extraction and High-performance liquid chromatographic separation of
Deflazacort and its metabolite 21-hydroxydeflazacort. Application to urine
samples.
J Chromatogr B Biomed Appl. 1994; 657:248-253.
doi: 10.1016/0378-4347(94)80096-0

- [9] Reynolds DL, Burmaster SD, Fichmeier LS. Quantitative determination of 21-hydroxy-deflazacort in human plasma using gradient semi-microbore liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 1994; 8:230-235. doi: 10.1002/bmc.1130080507.
- [10] Hirata H, Kasama T, Sawai Y, Fike RR. Simultaneous determination of deflazacort metabolites II and III, cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994; 658:55-61. doi:10.1016/0378-4347(94)00193-6
- [11] Möllmann H, Hochhaus G, Rohatagi S, Barth J, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of deflazacort in comparison to methylprednisolone and prednisolone. *Pharm Res.* 1995; 12:1096-1100. doi: 10.1023/A:1016287104656.
- [12] Rao N, Bhargava VO, Reynolds DL, Eller MG, Weir SJ. An investigation of the dose proportionality of deflazacort pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos.* 1996a; 17:753-760. doi: 10.1002/(SICI)1099-081X(199612)17:9<753::AID-BDD988>3.0.CO;2-D
- [13] Rao N, Eller MG, Arumugham T, Weir SJ. The effect of food on the relative bioavailability of deflazacort. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1996b; 21: 241-245.
- [14] Santos-Montes A, Isquierdo-Hornillos R. Optimization of separation of a complex mixture of natural and synthetic corticoids by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate. Application to urine samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 724: 53-63. doi: 10.1016/S0378-4347(98)00511-8.
- [15] Ifa DR, Moraes ME, Moraes MO, Santada V, Caliendo G, de Nucci G. Determination of 21-hydroxydeflazacort in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. *J Mass Spectrom.* 2000; 35:440-5. doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(200003)35:3<440::AID-JMS955>3.0.CO;2-8.
- [16] Ozkan Y, Savaser A, Tas C, Uslu B, Ozkan SA. Drug Dissolution Studies and Determination of Deflazacort in Pharmaceutical Formulations and Human Serum Samples by RP-HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2003; 13: 2141-2156. doi: 10.1081/JLC-120022399.
- [17] Corrêa GM, Bellé LP, Bajerski L, Borgmann SM, Cardoso SG.

Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*. 2007; 65:591-594.
doi: 10.1365/s10337-007-0205-y.

- [18] Görög S.
Recent advances in the analysis of steroid hormones and related drugs. *Anal Sci*. 2004; 20:767-782.
doi: 10.2116/analsci.20.761.
- [19] The United States Pharmacopoeia (2007) 31th Ed.,
United States Pharmacopoeial Convention, Rockville.
- [20] Görög S.
The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 2005; 36:931-937.
doi: 10.1016/j.jpba.2004.06.025
- [21] ICH – Q2 (R1) (2005) Guideline on Validation of Analytical Procedure. Text and Methodology.
- [22] Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., AOAC International, XVII.

**CAPÍTULO 4 – ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO DEFLAZACORTE:
IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA**

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes aos estudos de estabilidade do deflazacorte, isolamento, identificação do principal produto de degradação e avaliação da atividade antiinflamatória.

O estudo de estabilidade tem como objetivo conhecer as principais rotas de degradação de um fármaco, identificar o principal produto de degradação e fornecer informações úteis aos estudos de desenvolvimento de formas farmacêuticas. Estes estudos são utilizados para caracterizar o perfil de degradação, sendo esta uma avaliação importante para segurança e eficácia do fármaco.

Neste estudo, a estabilidade do deflazacorte foi avaliada sob condições de hidrólise ácida, alcalina e em solventes farmacêuticos. Através destes estudos foi possível isolar o principal produto degradado e avaliar a atividade antiinflamatória deste.

Os resultados obtidos serviram de referência para o desenvolvimento da suspensão de uso oral contendo deflazacorte.

O artigo será submetido ao Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Stability studies of Deflazacort: Identification of degradation product and evaluation of anti-inflammatory effect.

Amarilis Scremin^{a,e}; Anna Maria Deobald^b, Niraldo Paulino^{c,e} ; Mariana Obara Suzuki^c, Marcos Antonio Segatto Silva^a; Gabriela Rauber^a; Alexandra C.H.F.Sawaya^d; Marcos N. Eberlin ^d; Simone Gonçalves Cardoso^a.

^a Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brasil.

^b Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

^c Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

^d Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

^e Centro Universitário Barriga Verde, Orleans, SC, Brasil.

Corresponding author.

Amarilis Scremin

Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Farmácia. Campus Universitário - Trindade, Florianópolis, SC Brasil. CEP 80.000-000

Fone (5548) 3721-5066 fax (048)331-9542

e-mail: amarilis_paulino@yahoo.com.br

Abstract

Deflazacort (DFZ) is an oxazoline derivative of prednisolone with anti-inflammatory and immunosuppressive activity. The aim of this study was to investigate the stability of DFZ, to identify the main degradation product and to evaluate the anti-inflammatory effect of both DFZ and its main degradation product (DDP1). For identification HPLC, NMR, IR and LC/MS-MS were used. To investigate the anti-inflammatory effect of DFZ and DDP1 the methods of paw oedema, peritonitis, nitric oxide production and cell viability in RAW 264.7 cells were used. DDP1 was identified as 21-hydroxy deflazacort. The *in vivo* pharmacological assays showed that 1 or 10 mg/kg DFZ or DDP1 (i.p.) significantly inhibited paw oedema and decreased the number of neutrophils in peritonitis in mice, while *in vitro* assays showed that DFZ or DDP1 led to a decrease in nitrite concentration in the supernatant of RAW 264.7 macrophages without interfering with the viability of cells, as shown by the MTT test for determining cell viability.

In conclusion, we have shown that DFZ can be degraded in alkaline- and acid-medium to 21-hydroxy deflazacort. We have demonstrated also that DFZ and 21-hydroxy deflazacort are both active in *in vivo* and *in vitro* inflammatory models, but 21-hydroxy deflazacort is more potent than DFZ. Our results suggest that the anti-inflammatory effects produced by DFZ can be mediated, at least in part, by 21-hydroxy deflazacort.

Keywords: Deflazacort, Stability, HPLC, LC-MS, Anti-inflammatory.

Introduction:

Deflazacort (DFZ) (Fig. 1A) is an oxazoline (1-(1,16)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2-methyl-5H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazole-3,20-dione) (1), derivative of prednisolone with anti-inflammatory and immunosuppressive activity (2). The drug has been prescribed for treatment of rheumatoid arthritis, asthma and other applications such as: myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, thrombocytopenic purpura, Duchenne muscular dystrophy and kidney transplant patients (3, 4, 5). It is a corticosteroid with a lower risk of side effects than other available steroids (4, 5, 6). Several studies have demonstrated a very significant impact on health, quality of life and health care costs, with few side effects in children with Duchenne muscular dystrophy (6).

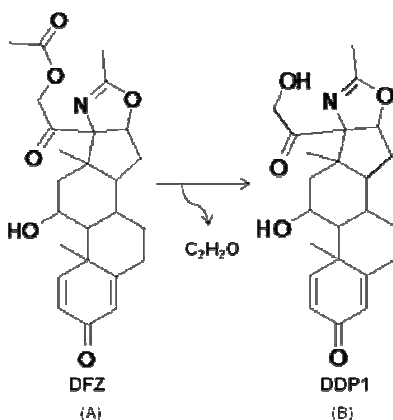


Fig. 1: Chemical structure of deflazacort (A) and its degradation product- DDP1: 21-hydroxy deflazacort (B).

The solid state properties of DFZ were investigated using thermal analysis, crystallography and spectroscopy. This study shows DFZ has a similar conformation in solid and liquid states (7). This glucocorticoid has an ester group which, like other glucocorticoids, may be susceptible to hydrolysis and degradation reaction in aqueous environment (8). Forced degradation studies were conducted by subjecting

standard samples to hydrolysis and oxidation by Correa et al, 2007 (9). Some corticoids show pH-dependent hydrolysis and to UV light in aqueous solution (8). There is little information available on the stability of DFZ and no degradation products have been identified yet.

The current drug stability test guide line Q1A (R2) issued by the International Conference on Harmonization (ICH) suggests that stress studies should be carried out on a drug to establish its inherent stability, leading to identification of degradation products (10). It is considered an important step for compliance with specifications, safety and efficacy of drug. Our study presents, for the first time, the isolation, identification and evaluation of the anti-inflammatory activity of the main DFZ degradation product (DDP1).

2. Experimental

2.1. Chemical and pharmaceutical assay

2.1.1. Material and Reagents.

DFZ used as reference standard was obtained from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Water was purified using a Millipore system Milli-Q Gradient. Sodium hydroxide, hydrochloric acid and anhydrous sodium sulfate were analytical grade and obtained from Vetec (São Paulo, Brazil). Chromatographic grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (São Paulo, Brazil). The mobile phases were filtered through a 0.45 µm PTFE Millipore membrane.

2.1.2. HPLC conditions.

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10 AD_{VP} pump, a SPD-10AV VP UV-Vis Detector, a SCL-10 A_{VP} system controller, a degasser module; data were acquired and processed by Shimadzu CLASS-VP 5.032 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). The column used was a RP₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size). The mobile phase consisted of water: acetonitrile (60:40, v/v), at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The injection volume was 20 µl and the detection was set a wavelength of 240 nm.

2.1.3. Stability studies in alkali- and acid- induced degradation product

The preparation of the alkali- or acid-induced degradation product was carried out by mean of 12.5 mg DFZ dissolved in 1 mL acetonitrile, volume was completed to 50 mL with 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl respectively. Samples were stored at 37 °C. Aliquots were collected at different times (0, 1, 2, 4 and 24 h). The solutions were neutralized with 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH and were evaluated by HPLC.

2.1.4. Isolation of DDP1

Unknown product induced by alkali conditions was used to isolate degradation product. DFZ (100 mg) was dissolved in 4.0 mL acetonitrile. The volume was completed to 25 mL with 0.1 N NaOH. The pH was adjusted to 6.5-7.0 with 1 N HCl. Solvent was evaporated in Savant SPD 1010 Speed Vac Concentrator, at ambient temperature. Residue was dissolved in methanol and anhydrous sodium sulfate, filter through quantitative paper filter. The methanol was evaporated in desiccator. The crystal obtained was used to identify degradation product.

2.1.5. Identification of DDP1

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

NMR experiments were acquired on a Bruker DPX 400 spectrometer, operating at 400 MHz. DMSO- d_6 was used as solvent.

IR Spectroscopy

IR experiments were performed with a *Shimadzu* FT-IR spectrometer on DFZ and DDP1. A 1 % (w/w) pressed discs were prepared, employing KBr.

Liquid Chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

For the LC analysis a Waters HPLC system was used. The chromatography conditions were used following the previous described in 2.1.2 with minor changes, the mobile phase consisted of water with 0.1 % formic acid and acetonitrile (60:40, v/v).

For the mass spectrometric analysis, an Analytical Biosystems, Q-TRAP was used. The ESI source was operated in positive ionization mode and its parameters were as follows: temperature, 300 °C; capillary voltage +5500 V, DP + 50 V. Nitrogen was used as the nebulizer and collision gas.

For the ESI-MS/MS spectra a Micromass Waters Q-TOF spectrometer was used under the following conditions: temperature 100 °C, 300 °C; capillary voltage +3000 V, cone +40 V. Nitrogen was used as the nebulizer gas and argon as the collision gas, collision 30 V.

2.2. Pharmacological assays

2.2.1. Drugs and reagents

Formic acid, methanol, ormalin, 2,2,2 tribromoethanol, prostaglandin E₂, lambda carrageenan grade IV, phosphate buffer solution (pH 7.6, composition mM: NaCl 137.0, KCl 2.0, and phosphate buffered salts 10.0), saline, TMB solution, L-glutamine, glucose, LPS, FBS, penicillin, streptomycin, NEAA, insulin, sodium pyruvate, HEPES, sulfanilamide, H₃PO₄, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, MTT, DMSO, TRAIL, and lactacystin were acquired from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.2.2. Animals

Adult male Swiss mice (18–30 g) were utilized in the experiments. The animals were maintained in an environment under controlled temperature (21 ± 2 °C) under daylight supplemented with electric light from 6:00 a.m. to 6:00 p.m., with access to food and water *ad libidum*. Throughout the experiments, animals were handled using the principles and guidelines for the care of laboratory animals according to Zimmermann (11) and following the guidelines of an Institutional Review Board.

2.2.3. Measurement of paw oedema

Measurement of paw oedema was performed according to Paulino et al 2008 (12) with slight modifications. Under slight anesthesia with 2,2,2 tribromoethanol (0.12 g/kg), male Swiss mice received a 20 µl i.d. injection in one hindpaw of phosphate

buffered saline (composition mmol.l^{-1} : sodium chloride 137, potassium chloride 2.7, and phosphate buffer 10) containing carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$). The contralateral paw received 20 μl of saline and was used as the control. Oedema was measured by use of a plethysmometer (Ugo Basile, Milan, Italy) at several times after injection of the irritant. Oedema is expressed in ml as the difference between the test and control paws. Animals were treated with DFZ or DDP1 (either 1 or 10 mg/kg) (i.p.) 1 h before the injection of irritant. Control groups received the same volume of the vehicle (sterile saline solution).

2.2.4. Acute carrageenan-induced inflammatory reaction in the peritoneal cavity of mice

Animals were treated with DFZ (1 mg/kg) or DDP1 (0, 1; 1 mg or 10 mg/kg) (i.p.) 1 h before induction of inflammation by means of carrageenan (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, i.p.).

After 4 h, the peritoneal fluid was collected in sterile and heparinized PBS (2 ml) for quantification of the cell numbers using a Neubauer chamber and the differential counting of leukocytes after concentration of the exudate and staining with May-Grünwald-Giemsa. Myeloperoxidase (MPO) activity was quantified by the H_2O_2 -dependent oxidation of TMB by addition of 25 μl peritoneal exudate, 25 μl 1.6 mM TMB, and 100 μl 0.3 mM H_2O_2 in 96-well plates. The optical density was measured at 450 nm and the enzyme activity calculated by comparison with a standard curve. Cell migration was quantified as previously described by Carvalho et al. (1999) (13).

2.2.5. Nitric oxide and cell viability quantification

Raw 264.7 cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium with 4 mM L-glutamine and 4.5 g/l glucose (DMEM, endotoxin level < 0.005 EU/mL, Bio Whittaker, Bioproducts, Heidelberg, Germany supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany). Cells were maintained at 37 °C, 5 % CO₂ and used for experiments between passage 4 and 12. Confluent cells were stimulated with 1 µg mL⁻¹ lipopolysaccharide (LPS) (*E.coli*, Serotype 055:B5 Sigma, Deisenhofen, Germany). Isoprenomics were dissolved in DMEM at the time the experiments were carried out.

RAW 264.7 cells were seeded in 96-well plates (4 x 10⁴ cells/well), and after 2 days were stimulated or not with 1 µg mL⁻¹ LPS in the presence or absence of DFZ or DDP1 (both 1, 10, or 100 µg mL⁻¹) for 20 h. The generation of nitric oxide was assessed in the supernatant of cell cultures by quantification of nitrite using the Griess reaction (14). Briefly, 100 µl of each supernatant was added to wells of 96-well plates, each containing 90 µl 1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid plus 90 µl 0.1 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in water. The optical density was measured at 550 nm. Cell viability was determined by mitochondrial-dependent reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan quantified at 550 nm. After removal of supernatant for nitrite determination, the cells were incubated with 0.5 mg mL⁻¹ MTT at 37 °C for 45 min, the medium was aspirated, and 250 µl of dimethyl sulfoxide was added to the reaction mixture for 3 h in the absence of light for solubilization of formazan.

2.2.6. Statistical analysis

For the *in vivo* studies, the results are presented as mean \pm standard deviation, except for the ID₅₀ values (i.e. the doses of extract necessary to reduce the response by 50 % relative to the control value), which are expressed as mean \pm standard deviation. The differences between the experimental groups were evaluated using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test or by Student's *t*-test. When appropriate, the ID₅₀ values were estimated from individual experiments by use of the least squares method. For *in vitro* studies, the responses are expressed as the statistical difference between control and treatment groups. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and pharmaceutical results

3.1.1. HPLC, stability study and isolation

The HPLC conditions were ideal to separate the main and other minor degradation products. It was validated according to ICH with correlation coefficient >0.99 , good selectivity, accuracy and precision. DFZ has retention time of 11.6 min. In acid and alkaline conditions, the main additional peak observed was DDP1, with retention time of 4.7 min. In 0.1N HCl relatively less degradation was observed and about 39.3 % of the major product DDP1 was detected after 24 hours. In 0.1N NaOH DFZ was immediately degraded. 99.0 % of product DDP1 was initially detected, and this product DDP1 was decomposed forming other products after 24hours.

Our results show that DFZ is hydrolyzed faster in basic media and more slowly in acidic media. Teng et al 2003, demonstrated the chemical stability of steroids. Mometasone in aqueous systems was significantly dependent on pH, with their maximum stability in weak acidic conditions (8).

The chromatogram for the alkali- and acid- induced degradation products are shown in Figure 2. DDP1 was isolated by alkali-induced after addition of 0.1N HCl.

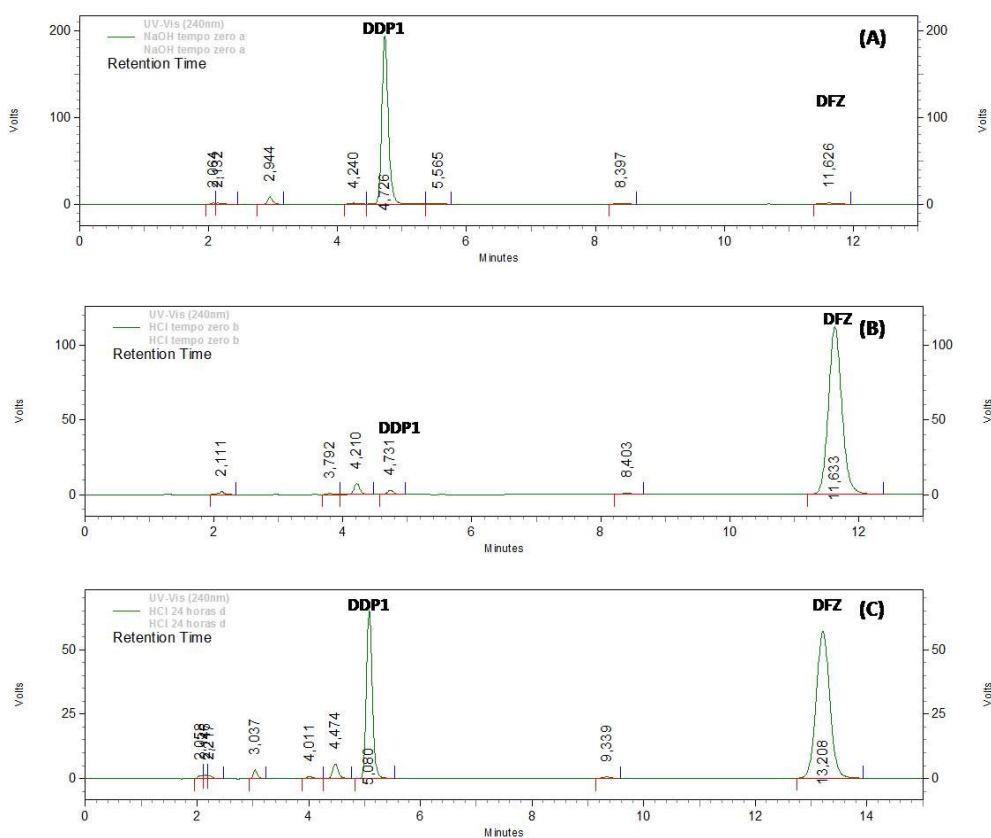


Fig. 2: Chromatograms showing decomposition of DFZ in alkali-induced degradation product (NaOH 0.1N), time zero (A); in acid-induced degradation product (HCl 0.1N) - time zero (B) and 24 hours (C).

3.1.2. Identification of DDP1

The degradation product was characterized through the results obtained from ^1H and ^{13}C experiments. The assignment of DFZ carbons is in accordance with data reported from Cuffini et al (7).

In the carbon NMR spectrum of DFZ we can observe the signal of a methyl ($\delta=20.3$ ppm) and a carbonyl ($\delta=169.5$ ppm). Differences in relationship carbon spectrum from DFZ and DDP1 is the absence of signal of a methyl ($\delta=20.3$ ppm) and of a carbonyl ($\delta=169.5$ ppm). The chemical shift of CH_2 21 was less shielded on DFZ ($\delta=66.68$ ppm) than on DDP1 ($\delta=65.67$ ppm) .

In the proton NMR spectrum of DFZ we can observe the signal of four methyl (singlets) with displacement in 0.898, 1.379, 1.891 and 2.098 ppm. On DDP1 we can see a minor electronic effect of OH group on C21, with doublets more shielded ($\delta=4.3$ ppm). There are three methyl with displacement in 0.854, 1.375, 1.859, and the singlet in 2.098 ppm disappear. The effect of ester group on DFZ molecule is higher than alcohol group and ester present is less shielded doublets ($\delta=4.8$ ppm).

Correlation between carbon and proton was performed by mean ^1H , ^{13}C HMQC. Our results shown that DDP1 produced is 21-hydroxy deflazacort (Fig. 1B).

The infrared spectrum of DFZ revealed three absorptions centered at 1749, 1730 and 1652 cm^{-1} , were assigned to the 22-CO, the 20-CO and the cyclic α - β unsaturated 3-ketone (3-CO), respectively (7). The spectrum of DDP1 revealed absence absorption at 1749 cm^{-1} , relative group 22-CO.

To confirm the identity of DDP1, LC-MS and MS/MS experiments were performed. DFZ has a retention time of 12 min, the relative molecular mass is 442 and the main

molecular ion obtained from MS spectrometric analysis was m/z 442 (=mass 441 + H). The m/z value of DDP1 isolate from alkali-induction was 399 (m/z 400). Degradation product of acidic-induced (DDP1) had the same mass 399 (m/z 400), that is in agreement with degradation product obtained in alkali-induced. This result is in agreement with results from NMR and IR, confirming the structure of DDP1.

Degradation reactions of steroids primarily occur at C-17 and C-21 side-chain, and this reaction is catalyzed by proton, hydroxide and trace metal ions (15). Studies have demonstrated that C-17 or/and C-21 esterified corticosteroids undergo hydrolysis in aqueous and biological media (8). DFZ is a C-21 esterified corticosteroid and lost the C_2H_2O group resulting in 21-hydroxy deflazacort (DDP1) (Fig.8).

3.2. Pharmacological results

3.2.1. Effect of DFZ and DDP1 on inflammatory models *in vivo*

In order to investigate the anti-inflammatory effects of DFZ and DDP1 *in vivo*, we employed animal models. Animals were initially treated with both DFZ and DDP1 followed by carrageenan-induced paw oedema measured at several time points (30 min to 360 min). In this model, 1 or 10 mg/kg DFZ or DDP1 (i.p.) significantly inhibited oedema induced by carrageenan, with a maximal average inhibition, respectively of 24 ± 2 % and 29 ± 3 % or 39 ± 3 % and 68 ± 4 % after 360 min with a performance measured by area under curve (AUC) mean significant between

groups: control 41.790, DFZ (1 to 10mg/kg) 33075 to 25590 or DDP1 (1 to 10mg/kg) 25620 to 12930 (Fig. 3 A and B).

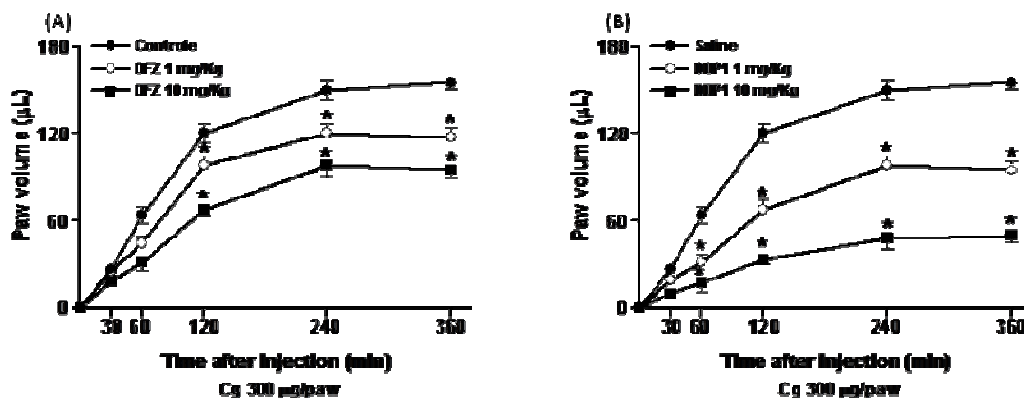


Fig. 3: Effects of DFZ (DFZ) (A) or DFZ Degradation Product 1 (DDP1) (B) (1 or 10 mg/kg) or saline on paw oedema model induced by carrageenan. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups, $P < 0.05$.

To further evaluate anti-inflammatory effects suggested by the paw oedema experiment, we tested DFZ or DDP1 (i.p.) in a carrageenan-induced model of peritonitis. The basal concentration of cells in the peritoneal cavity was 0.6×10^6 cells/mL but 4 hours after carrageenan administration, this concentration increased to 13.9×10^6 cells/ml, which we defined as 100 % cell migration. The percentage of neutrophils (84 ± 2 %) in the peritoneal exudate was higher than that of mononuclear cells (16 ± 3 %), an expected pattern in carrageenan-induced peritonitis (data not shown). When the animals were treated with DFZ (1 mg/kg) or DDP1 (0.1, 1 or 10 mg/kg) (i.p.), a statistically significant decrease in the total number of cells in the peritoneal cavity was observed, demonstrating inhibition of the inflammatory process (Fig. 4). DFZ (1 mg/kg) decrease in the number of neutrophils 46 ± 3 %, while DDP1 (0.1 mg/kg) did not affect the inflammatory response, but 1 or 10 mg/kg produced mean inhibition of 65 ± 3 % or 79 ± 4 %, with an estimated IC_{50} 0.77 (0.70-0.89) mg/kg.

DFZ or DDP1 led to statistically significant decreases in the number of neutrophils, which was proportional to decreases in myeloperoxidase activity (data not shown).

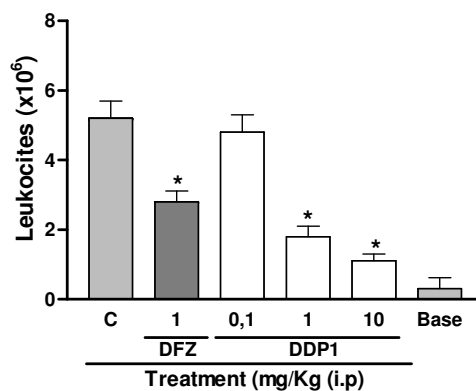


Fig. 4. Effects of the administration (i.p.) of DFZ (DFZ) (1mg/Kg) or DFZ Degradation Product 1 (0.1, 1, or 10 mg/kg, i.p.) on acute carragenan-induced inflammatory reactions, measured by the concentration of cells in the peritoneal fluid (peritonitis). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks indicate significant inhibition of the total number of cells in the peritoneal cavity in relation to the untreated groups, $P < 0.05$.

These results shown, in the first time, that the DFZ or its degradation product (DDP1) produced antiinflammatory effect *in vivo* and can suggest that the metabolization of DFZ *in vivo* produced a more active metabolite than DFZ with antiinflammatory effect. Our results are in accord with described by Omote et al (16) that indicate that while DFZ and 21-desacetyl-DFZ have stronger anti-allergic effects than prednisolone, they seem to have little acute effect on mast cell degranulation or on chemical mediators at the receptor site.

In fact, DFZ has been used to treat several diseases (2), such inflammatory process and Duchenne muscular dystrophy (17; 18). DFZ is an alternative glucocorticoid and helps to prevent bone loss and fat accumulation after kidney grafting. It may also contribute to the prevention of coronary heart disease by lesser impairment of the lipid profile compared with another glucocorticoids (19).

Based in our result we can propose that the anti-inflammatory activity of DFZ is mediated, at least in part, by mean of DDP1.

3.2.2. Effect of DFZ and DDP1 on inflammatory models *in vitro*

To measure the influence of DFZ and DDP1 on the reactivity of inflammatory cells, we used the macrophage cell line RAW 264.7. In this *in vitro* model, treatment with DFZ or DDP1 (both 1, 10, or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) led to a decrease in nitrite concentration in the supernatant of RAW 264.7 macrophages with respectively percentile $5\pm 1\%$, $21\pm 2\%$, $24\pm 2\%$ or $11\pm 1\%$, $46\pm 2\%$, $61\pm 3\%$. DDP1 show $\text{IC}_{50} = 15.4$ (11.7-27.8) $\mu\text{g/ml}$, while in LPS-stimulated cells, the nitrite concentration was $57.5 \pm 5.9 \mu\text{M}$ (Fig. 5A). For concentrations up to 100 $\mu\text{g/ml}$, DFZ or DDP1 did not interfere with the viability of RAW 264.7 cells, as shown by the MTT test for determining cell viability (Fig 5A and B).

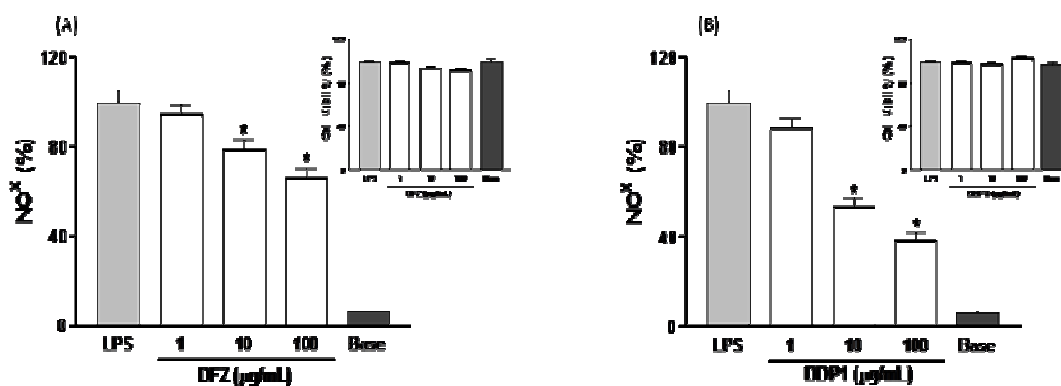


Fig. 5 Effects of treatment with DFZ (A) or DFZ Degradation Product 1 (DPP1) (B) (1, 10, or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on nitrite production by RAW 264.7 cells stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 20 h, or on respectively cell viability by MTT assay (b). Bars represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate and asterisks indicate significant inhibition of enzyme activity in relation to the untreated group, $P < 0.05$.

Therefore, we conclude that the effect of DFZ or DDP1 on nitrite production was specific to responses by macrophage.

4. Conclusion:

We have show in this work, for the first time, that DFZ can be immediately degraded in alkaline medium and more slowly acid medium to 21-hydroxy deflazacort, here named DDP1. The structure of this degradation product is based on NMR, IR spectroscopy, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) assays. We have shown also that DFZ and 21-hydroxy deflazacort are active in inflammatory models *in vivo* and *in vitro*. In the last step we have demonstrated that 21-hydroxi deflazacort is more potent than DFZ when tested in *in vivo* or *in vitro* inflammatory tests. Our results suggest that the anti-inflammatory effects produced by DFZ can be mediated, at least in part, by 21-hydroxy deflazacort.

Reference

1. M.J. O'Neil, M.J. *The Merck Index*. 14th, New York: Merck &co (2006).
2. A. Markham & H.M. Bryson. *Drugs*. 50 (1995) 317–333
3. W.D. Biggar, V.A. Harris, L. Eliasoph, B. Alman, *Neuromuscul. Disord*. 16 (2006) 249-255
4. C. Angelini, *Muscle Nerve* 4 (2007) 424-435
5. J. R. Ferraris, T. Pasqualini , G. Alonso, S. Legal , P. Sorroche, A.M. Galich, H. Jasper, *Pediatr. Nephrol*. 5 (2007) 734-741
6. R.E. Gonzalez-Castañeda, F.A.Castallanos-Alvarado, M.R. Flores-Marquez, O. Gonzalez-Perez, S. Luquin, J. Garcia-Estrada, C. Ramos-Remus, *Clin. Rheumatol*. 6 (2007) 935-40.
7. S.L.Cuffini, J.F. Ellena, Y.P. Mascarenhas, A.P. Ayala, H.W. Sielser, J.M. Filho, G.A. Monti, V. Aiassa, N.R. Sperandeo, *Steroids* 72 (2007) 261-269.
8. X.W. Teng, D.C. Cutler, N.M. Davies, *Int. J. Pharm*. 259 (2003) 129-141.
9. G.M. Corrêa, L.P. Bellé, L. Bajerski, S.H.M. Borgmann, S.G. Cardoso, *Chromatographia* 65 (2007) 591-594.
10. Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, United States Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, November 2003.
11. M. Zimmermann, *Pain* 6 (1983) 109–110.

12. N. Paulino, S. R. L. Abreu, Y. Uto, D. Koyama, H. Nagasawa, H. Hori, V. M. Dirsch, A. M. Vollmar, A. Scremin, W. A. Bretz, *European Journal of Pharmacology*, 587 (2008) 296-301.
13. J.C. Carvalho, J.A. Sertie, M.V. Barbosa, K.C. Patricio, L.R. Caputo, S.J. Sarti, L.P. Ferreira, J.K. Bastos, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1999) 127-133.
14. L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, *Anal. Biochem.* 126 (1984) 131-138
15. M.I. Amin, K.T. Koshy; J.T. Bryan, *J. Pharm. Sci.* 65 (1976) 1777-1779.
16. M. Omote, K. Sakai, H. Mizusawa, *Arzneimittelforschung* 44 (1994) 149-153.
17. S. Houde, M. Filiatrault, A. Fournier, J. Dubé, S. D'Arcy, D. Bérubé, Y. Brousseau, G. Lapierre, M. Vanasse, *Pred. Neur.* 38 (2008) 200-206.
18. S. Mavrogeni, A. Papavasiliou, M. Douskou, G. Kolovou, E. Papadopoulou, D. V. Cokkinos, *Europ. J. Ped. Neur.* 13 (2009) 34-40.
19. K. Lippuner, J.P. Casez, F.F. Horber, P. Jaeger. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 11 (1998) 3795-3802.

**CAPÍTULO 5 - DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO E ESTUDOS DE
ESTABILIDADE DE SUSPENSÃO ORAL CONTENDO
DEFLAZACORTE**

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes aos estudos de desenvolvimento de suspensão oral contendo deflazacorte e avaliação da estabilidade acelerada.

O principal objetivo do desenvolvimento de uma forma farmacêutica é a obtenção de um produto estável, que mantenha as características físicas, químicas e farmacológicas.

Para assegurar a qualidade de uma formulação é importante observar vários aspectos, como estabilidade química e física.

Neste estudo foram desenvolvidas suspensões orais contendo deflazacorte. Estas foram caracterizadas de acordo com pH, volume de sedimentação, redispersibilidade, avaliação microbiológica e teor.

De acordo com Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade a avaliação da estabilidade acelerada é projetada para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

As suspensões foram submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por 180 dias e avaliadas mensalmente.

O artigo será submetido ao Latin American Journal of Pharmacy.

Desenvolvimento, avaliação e estudos de estabilidade de suspensão oral contendo Deflazacorte

Titulo em inglês: Development, evaluation and stability studies of Deflazacort oral suspensions.

Amarilis SCREMIN^{a,c(*)}; Nivaldo PAULINO^{b,c}; Gabriela RAUBER^a; Simone Gonçalves CARDOSO^a.

^a Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brasil.

^b Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

^c Centro Universitário Barriga Verde, Orleans, SC, Brasil.

Corresponding author.

Amarilis Scremin

Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Farmácia. Campus Universitário - Trindade, Florianópolis, SC Brasil. CEP 80.040-900

Fone (5548) 3721-5066 fax (048)331-9542

e-mail: amarilis_paulino@yahoo.com.br

RESUMO

Deflazacorte (DFZ) é uma oxazolina derivada da prednisolona com atividade antiinflamatória e imunossupressora. Estudos de estabilidade do DFZ em tampão acetato (pH 4,48; 5,0; 5,4), tampão fosfato (pH 6,8) e solventes farmacêuticos foram realizados. DFZ demonstrou ser mais estável em tampão acetato pH 5,0 e na presença de PEG-400. Foram desenvolvidas 4 formulações na forma de suspensão para uso oral, usando carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como agente espessante. Sorbitol e PEG-400 foram utilizados como co-solventes farmacêuticos. Estas foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$) por um período de 180 dias. Os parâmetros avaliados foram características organolépticas, pH, perda de peso, tempo de redispersão, volume de sedimentação e quantificação do DFZ. As formulações F1 e F2 contendo CMC demonstraram ser mais estáveis.

Palavra chave: Deflazacorte, estabilidade, suspensão

SUMMARY

Deflazacort (DFZ) is an oxazolin derivative from prednisolone, with anti-inflammatory and immunosuppressive effect. Stability studies of DFZ were performed in acetate buffer (pH 4.48; 5.0; 5.4), in phosphate buffer (pH 6.8) and pharmaceutical solvents. DFZ demonstrated more stability in acetate buffer in pH 5.0 and in presence of PEG-400. We have developed four oral suspensions. The carboxymethylcellulose (CMC-Na) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) were used to provide viscosity and stability. Sorbitol and PEG-400 were used as co-solvent. These formulations were submitted to accelerated stability test ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of $75 \pm 5\%$) during 180 days. The parameters evaluated were organoleptic characteristics, pH, weight loss, re-dispersion time, sedimentation and quantification of DFZ. The formulation F1 and F2 containing CMC shown be more stable that F3 and F4 with HPMC.

Key words: Deflazacort, stability, suspension

INTRODUÇÃO

Deflazacorte (DFZ) (Figura 1) é uma oxazolina derivada da prednisolona com atividade antiinflamatória e imunossupressora. Ensaios clínicos com DFZ têm demonstrado menos efeitos adversos quando comparado a outros corticóides disponíveis. É utilizado no tratamento de doenças infantis tais como distrofia muscular (1,2) e em crianças transplantadas (3,4).

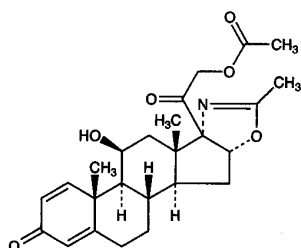


Figura 1: Estrutura química do Deflazacorte.

Formas farmacêuticas apropriadas para crianças não estão disponíveis e isto é um problema mundial, principalmente em países em desenvolvimento. O simples processo de reconstituição de pós não estéreis para uso oral pode ser um risco para estabilidade e segurança da formulação (5).

No Brasil, o DFZ não está disponível em uma forma farmacêutica líquida para uso pediátrico, entretanto, são preparadas na forma extemporânea, sem estudos de estabilidade.

O desenvolvimento de uma formulação inclui múltiplas considerações, tais como o fármaco, os excipientes, armazenamento, embalagem e estabilidade (6).

O DFZ assim como outros glicocorticóides pode ser susceptível a hidrólise e outras reações em meio aquoso (7). Há poucas informações disponíveis sobre a estabilidade do DFZ em meio aquoso e formulações líquidas. Cuffini et al

demonstraram que o DFZ no estado sólido é estável quando submetido à umidade e instável na presença de luz (8). Estudos de degradação forçada do DFZ demonstraram que o mesmo é estável à oxidação (H_2O_2 , 30 %), mas hidrolisa em meio ácido (ácido clorídrico 0,1 N) e alcalino (hidróxido de sódio 0,1N), com formação de produtos de degradação (9).

Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do pH e de co-solventes na estabilidade do DFZ, com o intuito de desenvolver uma suspensão de uso oral contendo o fármaco, avaliando a estabilidade dessa formulação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

DFZ, usado como substância química referência, sorbitol, glicerina, propilenoglicol, benzoato de sódio e polietilenoglicol 400 (PEG-400), carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose foram obtidos da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). Água foi purificada usando sistema Milli-Q. hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico, acetato de sódio e fosfato de sódio foram obtidos da VETEC (São Paulo, Brasil). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico foram obtidos da Tedia (São Paulo, Brasil).

Estabilidade do DFZ em solventes farmacêuticos

Inicialmente realizou-se estudo em dois diferentes tampões e em diferentes pH. O preparo das soluções foi realizado através da pesagem de 12,5 mg de DFZ, que foi dissolvido em 1 mL de acetonitrila e transferido para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com tampão acetato de sódio (pH 4,48; 5,0; 5,4) ou tampão fosfato de sódio (pH 6,8). As amostras foram mantidas em banho controlado de 37 °C. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos (0, 1, 2, 4 e 24 h). Para avaliar a influência de co-solventes, soluções contendo DFZ em tampão acetato de sódio pH 5,0 foram preparadas nas mesmas condições anteriores e acrescidas de sorbitol, glicerina ou PEG-400. Estas soluções foram mantidas em banho controlado de 37 °C, e avaliadas no tempo inicial e após 24 h. A concentração do DFZ nas diferentes condições foi avaliada através de método por CLAE, utilizando metodologia previamente validada nas seguintes condições: coluna C₁₈ (250 x 4.6 mm, 4 µm tamanho de partícula); fase móvel constituída de água:acetonitrila (60:40, V/V), fluxo de 1,0 ml min⁻¹ e detecção em 240 nm.

Desenvolvimento da suspensão

No desenvolvimento foram testadas 18 formulações contendo concentrações variadas dos seguintes componentes: espessantes poliméricos, (carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) e a Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)), tensoativo (polissorbato-80), co-solventes (sorbitol, glicerina ou PEG-400), conservante (benzoato de sódio), corretor de pH (ácido cítrico) e DFZ. A concentração final do DFZ na formulação foi de 10 mg/mL. As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 1. Para seleção das melhores formulações,

estas foram centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos e avaliadas quanto as características do sobrenadante e tempo de ressuspensão. Destas, foram selecionadas 4 formulações, de acordo com os melhores resultados obtidos, que foram produzidas, armazenadas em frasco de vidro âmbar, vedadas com tampa plástica e caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros: características organolépticas, pH, avaliação microbiológica, volume de sedimentação, tempo de redispersão, peso e determinação do teor (BRASIL, 2007).

Tabela 1: Concentração das matérias primas utilizadas no desenvolvimento da suspensão.

Formulação	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
Polissorbato 80 (ml %)	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,08
Glicerina (g%)	30	0	0	30	0	0	30	0	30	0	5	0	0	5	0	0	0	0
Sorbitol (g%)	0	30	0	0	30	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0
PEG-400 (g%)	0	0	30	0	0	30	0	30	0	30	0	0	5	0	0	5	0	0
CMC –Na (g%)	0,57	0,7	0,7	0	0	0	0,7	0,7	0	0	0,7	0,7	0,7	0	0	0	0,7	0
HPMC (g%)	0	0	0	0,8	0,8	0,8	0	0	0,8	0,8	0	0	0	0,8	0,8	0,8	0	0,8

Características organolépticas

Os aspectos avaliados foram: cor, odor e aparência das formulações conforme descritos na Farmacopéia Brasileira (1998) (10).

Determinação do pH

O pH foi determinado conforme a metodologia preconizada na Farmacopéia Brasileira (1988) (10), utilizando eletrodo de vidro em medidor de pH/mV marca WTW pH 3300i. As medidas de pH de cada formulação foram realizadas em triplicata.

Avaliação microbiológica

A contagem de microrganismos viáveis totais foi realizada pelo método de semeadura em profundidade (pour plate) conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (1988) (10) e USP (2007) (11). Os resultados foram expressos como UFC mL⁻¹.

Volume de Sedimentação

As formulações foram agitadas manualmente, mantidas em agitação magnética por 10 minutos e então transferidas para uma proveta graduada de 25 mL, e mantidas em repouso até total sedimentação. As leituras foram realizadas em triplicata nos seguintes tempos: 0, 1, 2, 4, 6, 24, 72 e 168 horas. Além disso, foram avaliadas visualmente as características do sedimento formado (12).

Tempo de redispersão

O ensaio foi realizado manualmente, seguindo metodologia proposta por Kittipongpatana e colaboradores (2006) (13), com as formulações em seus frascos

originais, realizando movimentos verticais de 180°, repetidos até a completa redispersão. O tempo necessário para redispersar o sedimento foi cronometrado e o resultado expresso em segundos (s). As medidas foram realizadas em triplicata para cada formulação.

Perda de peso

O produto foi pesado no tempo inicial e após 180 dias de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1988) (10).

Determinação do teor de substância ativa

O teor de substância ativa foi determinado através de método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), previamente validado, utilizando as seguintes condições: coluna C₁₈ (250 x 4.6 mm, 4 µm tamanho de partícula); fase móvel constituída de acetonitrila:água (80:20, V/V), fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm.

As amostras da suspensão foram mantidas em agitação magnética por 10 minutos. Alíquotas de 2 mL foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 25 mL. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se solução de 800 µg mL⁻¹. As soluções foram filtradas através de papel filtro quantitativo e diluídas com a fase móvel até a concentração final de 32 µg mL⁻¹. Solução da SQR foi preparada na mesma concentração e utilizada para determinar a quantidade de DFZ das amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

Estudo de estabilidade da suspensão.

As 4 suspensões selecionadas, denominadas de F1, F2, F3 e F4 foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$) por um período de 180 dias (14, 15). As avaliações foram realizadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante este estudo: características organolépticas, pH, perda de peso, tempo de redispersão, volume de sedimentação e quantificação do DFZ (15).

Análise estatística

Os resultados foram expressos com médias (\pm DP) das triplicatas e analisados através de ANOVA com *post test* recomendado ou teste *t* de Student, considerando o nível de significância de $P < 0,05$, obtidos através do programa Prism Instat (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estabilidade do DFZ em solventes farmacêuticos

Estudos têm demonstrado que alguns glicocorticóides que possuem ésteres esteroidais, como a betametasona 17-valerato (16), hidrocortisona hemisuccinato (16), hidrocortisona 21-lisinato (18) e mometasona furoato (7), apresentam hidrólise dependente do pH. Sahasranaman et al (2004) demonstraram que um aumento de pH leva a um aumento do percentual de degradação da mometasona furoato (19).

Estudos de degradação forçada do DFZ indicaram sua instabilidade em condições de hidrólise ácida e alcalina (9). No presente estudo avaliou-se a estabilidade do DFZ em tampão acetato (pH 4,48; 5,0 e 5,4) e em tampão fosfato (6,8), onde se evidenciou que em tampão acetato pH 5,0 o percentual de degradação do DFZ foi menor e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em relação aos pHs 4,48 e 5,40 nos diferentes tempos analisados, conforme pode ser observado na Figura 2. A significância estatística foi demonstrada através da aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey.

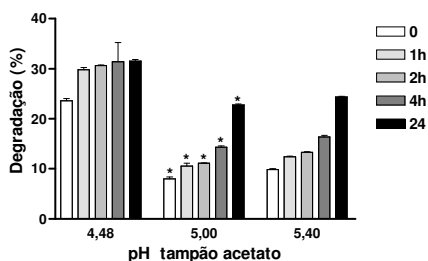


Figura 2: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão acetato nos pHs 4,48, 5,00 e 5,40 avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP) e avaliados através de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Em tampão fosfato pH 6,8 (Figura 3) o percentual de degradação do DFZ foi maior quando comparado ao tampão acetato pH 5,0.

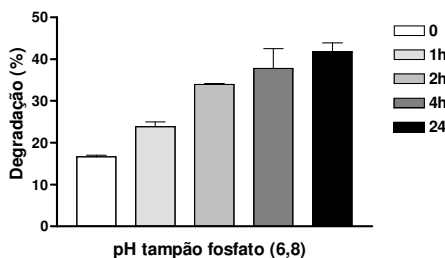


Figura 3: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão fosfato no pH 6,80 avaliado nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP).

A utilização de certos excipientes farmacêuticos é conhecida por melhorar a estabilidade física e química de componentes ativos. Os excipientes farmacêuticos servem de matriz ou interagem com o ingrediente ativo, podendo aumentar a estabilidade química e/ou biodisponibilidade. Estudos de estabilidade do rabeprazol com diversos excipientes farmacêuticos demonstraram que estes podem conferir uma melhor estabilidade em fluido intestinal simulado, melhorando assim a biodisponibilidade (20). Gaudin et al (2007) demonstraram que os solventes farmacêuticos podem interferir na estabilidade do artesunato, que se mostrou mais estável em etanol quando comparado ao PEG-400 (21).

Com o objetivo de avaliar a influência de alguns co-solventes comumente utilizados em suspensões, foram realizados estudos utilizando tampão acetato pH 5,0 acrescido de sorbitol, glicerina e PEG-400. Conforme pode ser observado na Figura 4, a adição de co-solventes interferiu no processo de degradação do DFZ. A presença de PEG-400 reduziu significativamente o percentual de degradação do DFZ em relação ao grupo controle tampão acetato (pH 5,0) e também em relação à glicerina e sorbitol.

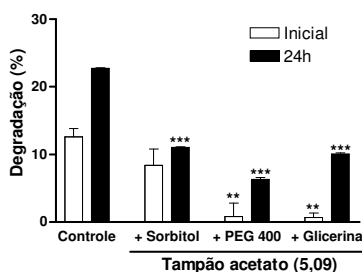


Figura 4: Avaliação do percentual de degradação do DFZ em tampão acetato no pH 5,00 associado a sorbitol, glicerina ou PEG-400 avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 24h. Os resultados são apresentados como média dos ensaios em triplicata (\pm DP) e avaliados através de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Desenvolvimento da suspensão

As suspensões constituem um importante grupo de formas farmacêuticas, mas também apresentam muitos desafios do ponto de vista de formulação e estabilidade físico-química. Para a obtenção de uma suspensão é necessário uma molhabilidade adequada da partícula sólida, ou seja, remoção do ar que está em contato com o sólido, e localização do líquido em torno da partícula. Se isto não ocorre, a dispersão fica dificultada (22).

Quando o fármaco é muito hidrofóbico torna-se necessário o uso de co-solventes, polímeros hidrofílicos e/ou tensoativos (23).

Os co-solventes são conhecidos pela sua capacidade solubilizante para fármacos pouco solúveis em água (24). Os polímeros hidrofílicos atuam como veículo estruturado, formando capas multimoleculares ao redor da partícula hidrofóbica, tornando esta mais hidrofílica e promovendo um aumento de viscosidade, diminuindo a velocidade de sedimentação das partículas dispersas. Os agentes tensoativos reduzem a tensão superficial entre o sólido e o líquido aumentando a molhabilidade (25).

As formulações de A a F (tabela 1) foram testadas com polímero hidrofílico e uma concentração de 30 % de co-solventes farmacêuticos. Os resultados obtidos para estas suspensões foram: sedimento não redispersível, flutuação do fármaco na superfície e partículas do fármaco aderidas na superfície de vidro.

A inclusão de agente tensoativo é útil na prevenção da formação de barreira hidrofóbica formada em contato com a água, aglomeração ou re-cristalização das partículas do fármaco após a dispersão (26).

O uso do agente tensoativo foi necessário devido à alta lipofília do DFZ (8). Os testes com as formulações contendo polissorbato-80 (G a J) demonstraram redução da flutuação e desaparecimento das partículas do fármaco aderidas à parede do vidro, com uma boa redispersibilidade do sedimento. Há evidências na literatura que os excipientes ou co-solventes, utilizados para possibilitar a formulação de fármacos pouco solúveis em água, podem ter um significativo efeito físico-químico e fisiológico, podendo alterar a absorção, distribuição e eliminação dos fármacos pouco solúveis em água, principalmente quando usado em altas concentrações (27).

Foram reduzidas as concentrações de co-solventes, sendo que as formulações foram testadas sem co-solventes e com 5 %. As formulações sem co-solventes não apresentaram uma redispersibilidade adequada. Com a redução do co-solvente para 5 % as formulações apresentaram formação de sedimento com boa redispersibilidade, não houve flutuação do fármaco ou aderência nas paredes do vidro.

Em função dos resultados obtidos foram selecionadas 4 formulações para o ensaio de estabilidade acelerada, conforme composição descrita na tabela 2.

Tabela 2: Composição das formulações F1, F2, F3 e F4 utilizadas para o ensaio de estabilidade acelerada.

Matéria prima	F1	F2	F3	F4
CMC (g%)	0,57	0,57	0	0
HPMC (g%)	0	0	1	1
Benzoato de sódio (g%)	0,1	0,1	0,1	0,1
DFZ (g%)	1	1	1	1
Polissorbato 80 (g%)	0,08	0,08	0,08	0,08
Glicerina (g%)	5	0	5	0
PEG-400 (g%)	0	5	0	5
Água qsp	100mL	100mL	100mL	100mL

Caracterização da suspensão

As suspensões foram caracterizadas de acordo com os parâmetros recomendados pelo guia para a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2007).

Características organolépticas

As características organolépticas podem ser avaliadas diretamente pelo paciente, devendo o produto apresentar um aspecto agradável ao mesmo. As suspensões preparadas apresentaram aspecto leitoso sob agitação, cor branca e odor característico.

Avaliação pH

O pH é uma constante físico-química importante na caracterização de formulações líquidas e está relacionado à solubilidade, estabilidade, atividade e absorção (23, 29). O pH das formulações desenvolvidas foi ajustado com ácido cítrico e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização das suspensões desenvolvidas: pH, redispersibilidade, determinação teor.

Formulação	F1	F2	F3	F4
pH (\pm DP)	5,14 \pm 0,01	5,12 \pm 0,03	4,86 \pm 0,01	5,02 \pm 0,02
Redispersibilidade (s)	15	10	10,2	15,7
Determinação teor (% \pm CV)	99,8 \pm 2,5	100,3 \pm 1,45	98,9 \pm 2,7	99,1 \pm 1,2

Redispersibilidade

A suspensão consiste de um sistema disperso, onde as partículas devem estar homogeneamente dispersas no veículo por um determinado período de tempo e após a sedimentação ressuspender facilmente. Quanto menor a densidade e o tamanho da partícula e maior a viscosidade da fase dispersante, mais lenta será a sedimentação (23, 29). As suspensões desenvolvidas redispersaram facilmente. O tempo de redispersibilidade está apresentado na tabela 3.

Volume de sedimentação

A razão entre o volume final de sedimento e o volume total é o parâmetro utilizado para verificar a estabilidade física da suspensão, sendo que quanto maior for o valor da razão (F) mais elevado será o grau de floculação (22). Para obter uma

suspensão aceitável seria ideal um F acima de 0,9 na primeira hora (30). Todas as formulações desenvolvidas apresentaram $F > 0,9$ nas primeiras 24 horas. As formulações contendo CMC-Na (F1 e F2) apresentaram um volume maior de sedimento, enquanto as formulações F3 e F4 apresentaram um sedimento mais compacto. Os resultados do volume de sedimentação das formulações desenvolvidas estão apresentados na Figura 5.

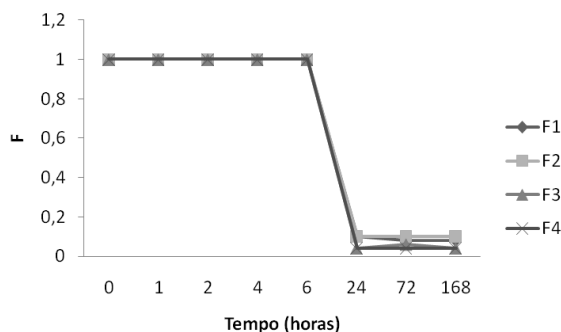


Figura 5: Volume de sedimentação (F) das formulações F1, F2, F3 e F4.

Determinação do Teor de substância ativa

A determinação do teor de DFZ ficou dentro da faixa de variabilidade de 5% indicada pela legislação (15), e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Avaliação microbiológica

Suspensão farmacêutica é classificada como um produto não estéril, onde se admite a presença de carga microbiana, embora limitada, tendo em vista as características de sua utilização (31). De acordo com a Farmacopéia Americana (2007), para preparações aquosas para uso oral o limite de bactérias totais permitida

é de 100 UFC mL⁻¹ e para fungos 10 UFC mL⁻¹. Os resultados encontrados foram <10UFC, tanto para bactérias quanto para fungos, com ausência de patógenos nas quatro formulações (11).

Estudo de estabilidade acelerada da suspensão

O estudo de estabilidade acelerada é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudança física de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas para o produto, que podem ocorrer em determinadas situações (15).

De acordo com o Guia para realização de estudo de estabilidade o limite de variação menor ou igual a 5 % na análise de teor confere um prazo de validade de 24 meses, enquanto entre 5,1 e 10 % o prazo de validade será de 12 meses, desde que sejam mantidas as demais especificações (15).

As suspensões preparadas mantiveram as características organolépticas durante os 180 dias de estabilidade acelerada.

O pH não apresentou alteração significativa nas formulações F1, F2 e F3. Na formulação F4 houve um decréscimo de 20,96 % em relação ao pH inicial, demonstrando ter ocorrido uma instabilidade na formulação.

O volume de sedimentação de todas as formulações avaliadas após 180 dias de estabilidade acelerada apresentaram um $F > 0,9$ na primeira hora, com

manutenção do tempo de redispersibilidade. Os resultados de redispersibilidade estão apresentados na Figura 6.

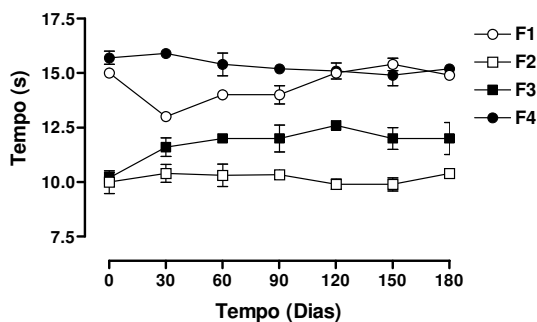


Figura 6: Redispersibilidade das formulações F1, F2, F3 e F4 durante o ensaio de estabilidade acelerada.

Os percentuais de perda de peso para a formulação F1 ficaram dentro do limite de 5 %, enquanto F2, F3 e F4 ficaram entre 5,1 e 10 %.

O teor de DFZ manteve-se dentro dos limites de 95-105 % para as formulações F1, F2 e F4. A formulação F3 apresentou um teor de 93 % após 180 dias. Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 7.

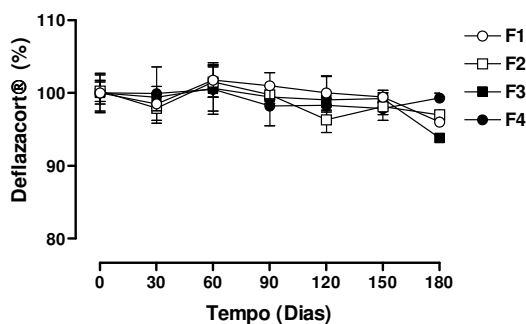


Figura 7: Determinação do teor de substância ativa das formulações F1, F2, F3 e F4 no ensaio de estabilidade acelerada.

Após 150 dias de estabilidade houve o aparecimento de um pico adicional ao DFZ nas formulações F1 e F2, o qual se manteve em concentração inferior a 5 %

até os 180 dias. Nas formulações F3 e F4 o aparecimento foi após 120 dias, com manutenção da concentração até 180 dias. A Figura 8 apresenta os cromatogramas das formulações F1, F2, F3 e F4 após 180 dias de estabilidade acelerada.

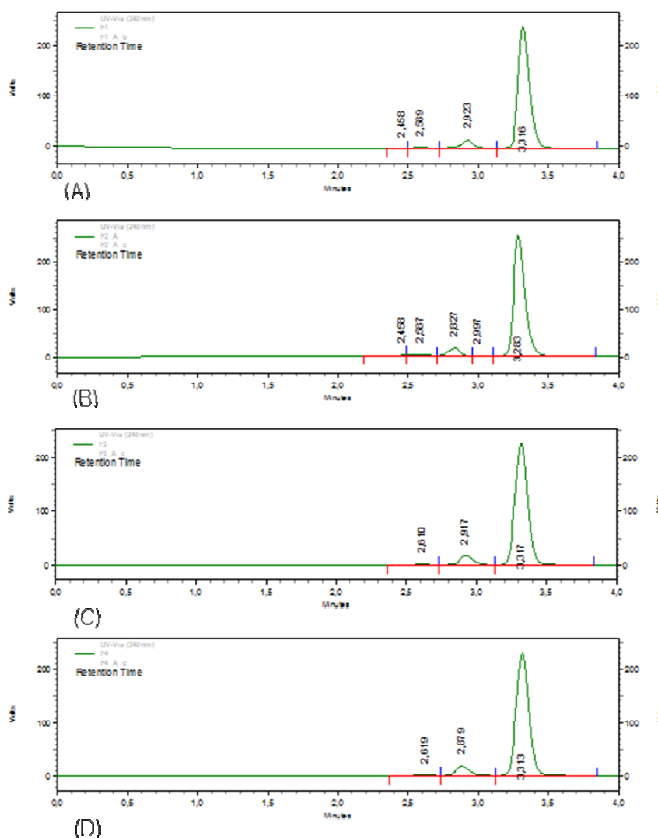


Figura 8: Cromatogramas das formulações F1 (A), F2 (B), F3 (C) e F4 (D) após 180 dias de estabilidade acelerada. **Condições:** Coluna C18 (250 x 4,6 mm x 4 μ m); Fase Móvel acetonitrila:água – 80:20 (v/v), fluxo 1,0 ml min⁻¹ e detecção 240 nm.

Comparando os resultados obtidos com as formulações contendo CMC-Na e HPMC pode-se concluir que as formulações contendo CMC-Na foram mais estáveis. Alguns autores estudaram o comportamento de CMC-Na e HPMC em diferentes suspensões e concluíram que polímeros aniônicos atuam por interações eletrostáticas e estéricas, enquanto polímeros não-iônicos atuam somente por meio de interação estérica (32, 33).

Os resultados obtidos demonstram que a formulação F1 foi a mais estável, devido à manutenção de todos os parâmetros dentro do limite de 5 %. A formulação F2 apresentou todos os parâmetros dentro do limite de 5 %, exceto a perda de peso que ficou entre 5 e 10 %. As formulações F3 e F4 foram as menos estáveis, devido a uma acentuada variação de pH e uma redução de teor superior a 5 %.

CONCLUSÕES

O pH interfere na estabilidade do DFZ em meio aquoso, e a adição de agentes umectantes pode reduzir este processo de degradação. Dos agentes umectantes utilizados, PEG-400 reduziu significativamente o percentual de degradação do DFZ em relação ao grupo controle e comparativamente à glicerina e sorbitol. Das 4 formulações selecionadas F1 e F2 mantiveram-se estáveis em todos os parâmetros avaliados. As formulações F3 e F4 apresentaram redução do teor de substância ativa e pH superior a 5% respectivamente. A metodologia utilizada detectou pequenas quantidades de um produto de degradação nas formulações contendo CMC (F1 e F2) após 150 dias, e nas formulações contendo HPMC (F3 e F4) após 120 dias de estabilidade acelerada. A formulação contendo CMC demonstrou ser mais estável quando comparada à formulação contendo HPMC.

Referencia bibliográfica

1. Houde, S., Filiatrault, M., Fournier A., Dubé J., D'Arcy S., Bérubé D., Brousseau Y., Lapierre G., Vanasse M. (2008) *Pred. Neur.* 38: 200-206.
2. Kinali M., Manzur A. Y., Muntoni F. (2008) *Paediatr child health.* 18:22-26.
3. Ferraris, J.R., Sorroche, P., Lega, S., Oyhamburj, J., Brandi, P., Pasqualini T. (1998) *J Pediatr.* 133:533-535.
4. Ferraris, J. R., Pasqualini T., Alonso, G.; Lega, S., Sorroche, P., Galich, A.M., Jasper, H. (2007) *Pediatr. Nephrol.* 5, 734-741.
5. WHO. Promoting safety of medicine for children. www.who.int/entity/medicines/publications/essentialmedicines/Promotion_safe_med_childrens.pdf
6. Allen, L. V. Jr. (2008) *Clin. Ther.* 20:2102-2111.
7. Teng, X. W., Cutler, D. C., Davies, N.M. (2003) *Int. J. Pharm.* 259:129-141.
8. Cuffini S. L., Ellena J. F., Mascarenhas, Y.P., Ayala, A.P., Sielser, H.W., Filho, J.M., Monti, G.A., Aiassa, V., Sperandeo, N.R. (2007) *Steroids* 72:261-269.
9. Corrêa, G.M. Bellé, L.P., Bajerski, L., Borgmann, S.H.M., Cardoso, S.G. (2007) *Chromatographia* 65:591-594.
10. *"Farmacopéia Brasileira"* (1988) 4ª ed: Atheneu, São Paulo.
11. USP - THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (2007) 30 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention.
12. Attwood, D. (2005) in Aulton, M.E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas.* 2ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre.
13. Kittipongpatan, O. S., Sirithunyalug, J., Laenger, R. (2006). *Carbohydr Polym* 63:105-112.

14. ICH - Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2005, on line, <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em 05.03.2007.
15. BRASIL, RE nº 1, de 29 de julho de 2005. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível em < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word=#>>. Acesso em: 18.04.2007.
16. Bundigaard, H., Hansen, J. (1981) Int. J. Pharm. 7:197-203.
17. Mauger, J.W., Paruta, A.N., Gerraughty, R.J. (1969) J. Pharm. Sci. 58:574-578.
18. Jonhson, K., Amidon, G.L., Pogany, S. (1985) J. Pharm. Sci. 74: 87-89.
19. Sahasranamna, S., Issar, M., Tóth, G., Horváth, Gy., Hochhaus, G. (2004) Pharmazie. 59:367-373.
20. Ren, S., Park, M.J., Sah, H., Lee, B.J.(2008) Int. J. Pharm. 350:197 – 204.
21. Gaudin K., Langlois M.H., Barbaud A., Boyer C., Millet P., Fawaz F., Dubost J.P. (2007) J Pharm. Biomed. Anal.. 43:1019-24.
22. Lachman, L., Lieberman, H.A., Kaning, J.L. (2001) *“Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica”*. (Fundação Calouste), Lisboa, Vol. 1 e 2.
23. Gennaro, A.R. (2004). A Ciência e a Prática da Farmácia. 20 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.
24. Zhao, L., Li, P. (2007) Int. J. Pharm. 341:1-19.
25. Aulton, M.E. (2005). Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre.
26. Pouton, C.W. Eur J Pharm Sci. (2006). 29: 278-287.

27. Buggins, T.R., Dickinson, A., Taylor, G. (2007) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1482-1503.
28. Florence, A. T.; Attwood, D. (2003) "Princípios Físico-Químicos em Farmácia". USP, São Paulo.
29. Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. R. (1995) "Técnica Farmacêutica e Farmácia Galenica". (Fundacao Calouste Gulbenkian), Lisboa.
30. Gabriëls, M., Plaizier-Vercammen, j. (2004). *Int. J. Pharm.* 283:19-34
31. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T. (2003) "Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos". Ed. Atheneu, Sao Paulo.
32. Duro, R.; Alvarez, C.; Martinez-Pacheco, R.; Gomez-Amoza, J.L., Concheiro, A.; Souto, C. (1998). *Eur J Pharm Biopharm.* 45:181–188.
33. Pawlik, M. (2005). *Colloid Surfaces A.* 266: 82-90.

DISCUSSÃO GERAL

Os glicocorticóides são os mais eficazes antiinflamatórios disponíveis, sendo conhecidos há mais de 50 anos e têm seu papel central no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios. Para uso sistêmico agudo não se observam efeitos indesejáveis. Para uso sistêmico crônico, é importante uma escolha adequada devido aos efeitos indesejáveis que podem ocorrer. Vários efeitos adversos podem ser destacados, incluindo osteoporose, diabetes mellitus, aumento peso e hipertensão (FUCHS, 2004; LONGUI, 2007).

O DFZ é um glicocorticóide que apresenta estudos que comprovam a redução dos efeitos indesejáveis quando comparado a outros glicocorticóides, principalmente os de uso crônico, sendo um fármaco importante para a terapêutica. Encontra-se disponível na forma de comprimidos, cápsulas manipuladas e suspensão oral. A suspensão oral atualmente não é comercializada no Brasil na forma industrializada, sendo comercializada na forma manipulada. É uma forma extremamente importante principalmente para pacientes com dificuldade de ingestão e pacientes pediátricos.

Apesar dos inúmeros estudos farmacológicos que demonstram a eficácia e a redução dos efeitos colaterais, existem poucos estudos de controle de qualidade, de desenvolvimento de formulações e estudos de estabilidade do DFZ, e não existem, até o momento, monografias farmacopéicas para o fármaco. Os estudos de avaliação da qualidade e estudos de estabilidade do DFZ tornam-se, assim de grande relevância para a indústria e no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

Considerando o exposto, e a partir de resultados obtidos por Correa (2006) planejou-se, no presente trabalho, estudar as características de estabilidade do DFZ, isolar e identificar o principal produto de degradação e, a partir destas informações, desenvolver uma suspensão de uso oral, avaliando a estabilidade desta formulação.

Antes de qualquer estudo é necessário o uso de uma metodologia adequada para o controle de qualidade e a quantificação de um fármaco. Foram, então, desenvolvidos e validados métodos para quantificação do fármaco em suspensão oral e comprimidos. A seguir, foram realizados os demais estudos, que envolveram

técnicas específicas. Para complementar os estudos foram realizados ensaios farmacológicos para avaliar a atividade antiinflamatória do DFZ e do principal produto de degradação isolado.

1. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A escolha de um método depende de diversos fatores tais como a natureza do fármaco, complexidade da amostra e a finalidade do método. Em análise farmacêutica os métodos são utilizados para avaliar a matéria-prima e produtos intermediários de síntese; contribuem para a pesquisa de novos fármacos e desenvolvimento de formulações, e na avaliação de impurezas e produtos de degradação. Os métodos são essenciais para garantir a qualidade, a eficácia e a segurança terapêutica (GOROG, 2007).

O desenvolvimento e a validação de um método devem garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

De acordo com GOROG (2004), o método predominante para análise de esteróides é a CLAE com detecção UV, no entanto métodos espectrofotométricos ainda são amplamente utilizados, devido ao baixo custo e facilidade de execução.

No presente trabalho foram estudados métodos espectrofotométricos e por cromatografia líquida de alta eficiência para análise do DFZ. A validação foi realizada conforme ICH (2005), USP 29 (2005) e resolução 899 (BRASIL, 2003).

Os métodos espectrofotométricos estão descritos nas farmacopéias e são considerados métodos não-específicos. Estes são baseados na absorção natural UV-VIS ou através de reações colorimétricas. Muitos fármacos absorvem a radiação no espectro do ultravioleta enquanto outros absorvem na região do visível (WATSON, 1999), e a quantificação de fármacos por este método pode ser fácil, rápido e de custo relativamente baixo (CLURCZARC, 1998).

Os métodos desenvolvidos no presente trabalho foram baseados naqueles apresentados por Correa (2006) para comprimidos.

Os métodos por espectrofotometria e CLAE avaliados foram validados e demonstraram ser adequadas ao objetivo proposto, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade, podendo ser utilizado para o controle de qualidade do DFZ em suspensão oral. Verificou-se, através de análise estatística, que os resultados obtidos através do método colorimétrico não foram equivalentes àqueles obtidos por espectrofotometria no UV e CLAE. A especificidade do método colorimétrico, baseado na redução do grupamento α -cetol dos corticosteróides, não foi superior ao método de absorção natural, além das desvantagens deste método, como por exemplo, o tempo de execução da técnica, trabalho e a baixa precisão. O tempo de execução e a boa precisão são vantagens do método por UV quando comparado ao método colorimétrico (GOROG, 2005). O método por CLAE é excelente, sendo mais seletivo, específico e preciso.

Os resultados e discussão da validação dos métodos encontram-se descritos no manuscrito apresentado no Capítulo 3, onde foram incluídos, também, os resultados observados para comprimidos, que não haviam sido ainda publicados.

2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO DEFLAZACORTE

As propriedades do DFZ no estado sólido foram avaliadas por Cuffini et al. (2007) usando análise térmica, cristalografia e espectroscopia.

O DFZ, assim como outros glicocorticóides, apresenta um grupamento éster que é susceptível à hidrólise e degradação em meio aquoso. Estudos de degradação forçada realizados com o fármaco em meio ácido, alcalino e oxidativo, demonstraram que o DFZ é estável à oxidação, porém instável em meio ácido e alcalino (CORRÊA et al, 2007). Alguns corticóides apresentam hidrólise dependente de pH e luz em solução aquosa (TENG et al., 2003).

O guia de estabilidade do ICH (Q1A-R2) e (Q3A-R2) sugere que os estudos de estabilidade sejam realizados com o objetivo de estabelecer a estabilidade

intrínseca do fármaco, conhecer as rotas de degradação, identificar os produtos de degradação e auxiliar no desenvolvimento de produtos. Estes estudos são utilizados para caracterizar o perfil de degradação, sendo uma avaliação importante para segurança e eficácia do fármaco.

Conforme já indicado, existem poucos estudos de estabilidade do DFZ, principalmente em meio aquoso e, até o momento, nenhum produto de degradação foi isolado e identificado.

Neste sentido, foram realizados estudos com o objetivo de avaliar a formação de produtos de degradação e verificar em quais meios estes eram formados. Inicialmente foram realizados estudos utilizando a metodologia por CLAE validada para a suspensão oral, utilizando as condições descritas no artigo 1. No estudo de degradação foi utilizado NaOH 0,1N e, já no tempo zero, foi observado o aparecimento de dois picos adicionais ao do DFZ, com tempos de retenção muito próximos (2,6 min. e 2,8 min.), conforme se observa no cromatograma apresentado no Apêndice A. A proximidade destes picos dificultou a separação do principal produto de degradação observado, tornando-se necessária uma otimização do método. Para uma melhor separação dos picos foram feitas alterações na polaridade da fase móvel. Foram testadas as seguintes proporções de fase móvel constituída de água:acetonitrila: 50:50; 65:35; 60:40. A fase móvel que proporcionou uma melhor separação dos picos foi água:acetonitrila (60:40), conforme demonstrado no cromatograma apresentado no Apêndice B. O DFZ, nestas condições, apresentou um tempo de retenção de 12,5 min, enquanto os picos adicionais apresentaram resolução superior a 2. Embora estudos de avaliação da pureza dos picos não tenham sido realizados, considerou-se, para fins de apresentação, que cada pico era referente a um único produto de degradação, que foram denominados de DDP1, DDP2 e DDP3.

Os resultados obtidos no estudo de degradação estresse demonstraram que o DFZ apresentou uma degradação imediata, de quase 100% em meio alcalino, com formação de um único pico, que recebeu a denominação DDP1, com tempo de retenção de 4,74 min. O DDP1 formado inicialmente degradou-se, com aparecimento de outro pico, com tempo de retenção de 2,19 min, o qual foi denominado DDP3. Outro pico, denominado DDP2, apareceu em pequeno

percentual, e manteve-se na mesma concentração desde o início até o final do estudo. A quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em meio alcalino (NaOH 0,1N), no intervalo de tempo de 24 horas, estão apresentados no Apêndice C.

No estudo de degradação em meio ácido (HCl 0,1N) a degradação do DFZ foi menos intensa, mas observou-se o aparecimento de dois picos adicionais ao pico do DFZ, os quais apresentaram tempos de retenção semelhantes àqueles observados em meio alcalino, sugerindo serem os mesmos produtos DDP1 e DDP2. A quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em meio ácido (HCl 0,1N), no intervalo de tempo de 24 horas, está demonstrado no Apêndice D. Novos estudos de degradação forçada foram realizados utilizando HCl 1N. Estes demonstraram que os mesmos produtos DDP1 e DDP2 foram formados, mas em um percentual maior (Resultado não demonstrado).

Como a literatura relata que os glicocorticóides podem sofrer hidrólise dependente de pH em meio aquoso (BUNDGAARD e HANSEN, 1981; MAUGER et al., 1969; JONHSON et al., 1985; TENG, 2003) foram realizados estudos para avaliar a estabilidade do DFZ frente ao pH, utilizando tampão acetato (pH 4,48; 5,0 e 5,4) e tampão fosfato (pH 6,8).

Nas condições indicadas foi possível demonstrar que em pH 5,00 o percentual de degradação do DFZ foi bem menor, quando comparado ao percentual de degradação observado em condições de hidrólise alcalina, e foi estatisticamente diferente daquele observado em pH 4,48 e em pH 5,40. Em pH 5,0 também houve aparecimento de produto de degradação, com tempo de retenção semelhante ao produto DDP2, mas em percentual inferior ao observado no estudo de degradação realizado em meio alcalino. A quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em tampão acetato (pH 5,0), no intervalo de tempo de 24 horas, está demonstrado no Apêndice E. Em tampão acetato pH 4,48 e pH 5,4 também houve a formação do mesmo produto de degradação, DDP2.

Em tampão fosfato pH 6,80 o percentual de degradação do DFZ foi maior quando comparado ao tampão acetato. Os produtos de degradação formados apresentaram tempos de retenção semelhantes aos produtos DDP1 e DDP2. A

quantificação destes, no intervalo de tempo de 24 horas, está demonstrada no Apêndice F.

A avaliação dos percentuais de degradação nos tampões usados neste estudo, nas respectivas faixas de pH, sugere que o tampão acetato pH 5,0 foi o melhor meio para garantir a estabilidade do DFZ, indicando que o pH e o meio utilizado interferem no processo de degradação do DFZ, assim como observado por outros autores, para furoato de mometasona (SAHASRANAMAN et al., 2004).

Como um dos objetivos do presente trabalho era o desenvolvimento de uma suspensão de uso oral, houve a preocupação de avaliar a influência de alguns co-solventes comumente utilizados em suspensões. Os estudos foram realizados utilizando o tampão acetato pH 5,0, no qual o DFZ foi mais estável, acrescido de sorbitol, glicerina e PEG-400. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de PEG-400 reduziu significativamente o percentual de degradação do DFZ em relação ao grupo controle e também em relação à glicerina e sorbitol, em ambos os tempos avaliados (tempo inicial e após 24 horas).

Os resultados obtidos permitiram concluir que a estabilidade química do DFZ em um sistema aquoso foi significativamente dependente do pH, que o aumento do pH aumentou a degradação do fármaco e que os co-solventes farmacêuticos podem interferir na sua estabilidade, podendo promover uma redução no processo de degradação. Essas informações serviram de base para isolar o principal produto de degradação formado (DDP1) e para estabelecer as melhores condições de estabilidade para o DFZ no desenvolvimento da formulação da suspensão oral.

Para realizar o isolamento do DDP1 foram avaliadas as técnicas por cromatografia de camada delgada e por CLAE preparativa. Ambos os métodos não foram eficientes devido à instabilidade do DDP1, que se degrada em DDP3 em determinadas condições. A condição que permitiu uma maior formação do DDP1 foi a que utilizou NaOH 0,1N, e esta precisou ser cuidadosamente avaliada para evitar a degradação do DDP1, como ajuste do pH para 6,5-7,0 com HCl 1N, imediatamente após a adição do NaOH 0,1N, evaporação do diluente com vácuo em temperatura ambiente, o uso do sulfato de sódio anidro e processo de recristalização.

As técnicas utilizadas para identificação do DDP1 foram à ressonância magnética nuclear (RMN) de carbonos e hidrogênios, a espectroscopia na região do infravermelho (IR) e a CLAE acoplada à Massa (LC-MS) (Apêndices G a L).

As reações de degradação dos esteróides ocorrem principalmente na cadeia lateral do C-17 e C-21, sendo estas reações catalisadas por prótons, hidróxidos e íons metálicos (AMIN et al., 1973; BUNDGAARD e HANSEN, 1981). Estudos têm demonstrado a hidrólise dos corticosteróides em meio aquoso e biológico (TENG et al., 2003). O DFZ é um corticóide que apresenta uma esterificação no C-21, podendo ocorrer hidrólise nesta parte da molécula com a perda do grupamento C_2H_2O . No organismo, este processo gera o metabólito ativo do fármaco, o 21-hidroxideflazacorte. Através das técnicas de identificação utilizadas foi possível indicar que o produto DDP1 isolado corresponde à estrutura do 21-hidroxideflazacorte. Ressalta-se que o isolamento e identificação de produtos de degradação do DFZ não foram ainda apresentados na literatura, constituindo-se em importante contribuição deste trabalho. Os resultados e discussão desta etapa do estudo encontram-se descritos no manuscrito apresentado no Capítulo 4.

Simultaneamente à identificação do DDP1 foram realizados estudos para investigar a atividade antiinflamatória deste e do DFZ, avaliando o efeito antiinflamatório dos compostos no modelo da peritonite e, de modo complementar, em modelo *in vitro* em linhagens de macrófagos murinos. Os resultados obtidos demonstraram, pela primeira vez que o DFZ ou o seu metabólito apresentaram efeito antiinflamatório *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que a metabolização do DFZ *in vivo* pode produzir um ou mais metabólitos ativos com ação antiinflamatória. Esta afirmação está de acordo com o trabalho descrito por Omote e colaboradores (1994), que demonstra que tanto o DFZ quanto o 21-hidroxideflazacorte têm efeito anti-alérgico superior ao apresentado pela prednisolona, associado a um pequeno efeito agudo sobre a degranulação dos mastócitos ou sobre a liberação química de mediadores no sítio dos receptores.

O deflazacorte possui biodisponibilidade de 68 % pela via oral, com uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas de 40 %, e um tempo de meia vida que varia entre 1,9 a 2,3 h. Esses dados correspondem aos resultados encontrados nos modelos *in vivo* e *in vitro* estudados para o efeito antiinflamatório. Nos experimentos

realizados, as doses utilizadas de DFZ e 21-hidroxi-deflazacorte foram estatisticamente significativas a partir de 2 horas após a administração oral de ambos. É bem descrito que o DFZ é metabolizado, por ação de esterases, em 21-hidroxi-deflazacorte, aparecendo no plasma humano como resultado do metabolismo primário do deflazacorte (REYNOLDS, 1994; IFA et, 2000) e eliminado pela urina e fezes nessa forma (Santos-Montes, 1994).

Baseado nos resultados químicos e farmacológicos obtidos pode-se propor que o deflazacorte produz um metabólito ativo que, contribui em parte, para o seu efeito antiinflamatório. Este fenômeno já está bem descrito na literatura para outros fármacos, como a prednisona/prenisolona (FREY E FREY, 1990), mas está sendo proposto pela primeira vez, neste trabalho, para o sistema deflazacorte/21-hidroxi-deflazacorte para a ação antiinflamatória.

Além do efeito antiinflamatório o 21-hidroxi-deflazacorte, conforme ICH (2006) pode ser um produto de degradação qualificado, visto que foi encontrado como metabólito ativo em estudos animais e ensaios clínicos em humanos.

3. DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES CONTENDO DFZ

Os fármacos raramente são administrados isoladamente, geralmente fazem parte de uma formulação combinada a outros componentes, os excipientes farmacêuticos. Estes podem exercer funções farmacêuticas variadas e especializadas. Especificamente são os excipientes da formulação que permitem solubilizar, suspender, espessar, conservar, emulsionar, modificar a dissolução, facilitar o processo de fabricação, corrigir as características organolépticas do fármaco entre outras, possibilitando assim a obtenção de uma forma farmacêutica estável (AULTON, 2005; ALLEN, 2008).

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica deve considerar as características físicas, químicas, físico-químicas de todos os componentes da formulação, assim como a anatomia fisiológica do local de administração e absorção. O fármaco e os excipientes utilizados devem levar a um produto estável, eficaz, fácil de administrar e seguro (ANSEL, 2000; ALLEN, 2008).

Para o desenvolvimento de uma suspensão, os excipientes utilizados vão depender principalmente das características do fármaco. Estas normalmente são constituídas por um meio aquoso e dependendo do fármaco são necessários alguns excipientes como co-solventes, tensoativos, agentes espessantes e conservantes (BILLANY, 2005).

Variações nas proporções dos componentes da formulação podem levar a alterações do aspecto físico, tempo de sedimentação e redispersibilidade em uma suspensão, o que acarretaria dificuldade na ressuspensão e uma alteração da dose correta. Isto demonstra a importância de um cuidadoso estudo antes do desenvolvimento de uma formulação.

O DFZ por ser um fármaco de característica hidrofóbica, com absorção no trato gastrointestinal, pôde ser formulado na forma de suspensão.

Inicialmente foram testadas 18 formulações, cujas composições estão descritas na tabela 1, capítulo 5. Os parâmetros de avaliação dos ensaios iniciais foram: pH, centrifugação, característica do sobrenadante e tempo de ressuspensão após centrifugação.

Em função dos resultados obtidos foram selecionadas 4 formulações, (denominadas F1, F2, F3 e F4) para o ensaio de estabilidade acelerada, por um período de 180 dias. Os resultados obtidos indicaram que a formulação F1 foi a mais estável devido à manutenção de todos os parâmetros dentro do limite de 5 %, conferindo um prazo de validade de 24 meses. A formulação F2 apresentou todos os parâmetros dentro do limite de 5 % exceto a perda de peso que ficou entre 5 e 10 %, conferindo um prazo de validade de 12 meses. A formulação F4 foi considerada instável, devido a uma acentuada variação de pH e a formulação F3 apresentou uma redução de teor superior a 5 %.

Um estudo mais aprofundado das formulações F1 e F2 serão necessários, tais como viscosidade, determinação de tamanho de partícula, potencial zeta e desenvolvimento do teste de dissolução. Estudos de estabilidade em outras temperaturas são importantes para determinação da cinética de degradação do fármaco.

Como DFZ pode degradar na presença de luz, estudos de fotoestabilidade são essenciais para avaliação da estabilidade.

Os resultados e discussão desta etapa do estudo encontram-se descritos no manuscrito apresentado no Capítulo 5.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES

- O DFZ foi devidamente identificado e quantificado através de técnicas adequadas a este fim, o que possibilitou a utilização da matéria-prima como SQR.
- Os métodos por espectrofotometria (na região do ultravioleta e do visível) e CLAE foram otimizados e devidamente validados para quantificação de DFZ em suspensão de uso oral.
- Os métodos por UV e CLAE foram estatisticamente equivalentes, e podem ser utilizados para a determinação do teor de DFZ em suspensão de uso oral.
- A estabilidade química do DFZ em meio aquoso é pH dependente, e o aumento do pH promoveu maior degradação do fármaco. O pH 5,0 foi o que propiciou maior estabilidade para o fármaco.
- Os co-solventes farmacêuticos (Sorbitol, Glicerina e PEG 400) interferiram na degradação do DFZ, sendo que a utilização de PEG-400 permitiu uma maior estabilidade do fármaco em solução.
- O principal produto de degradação do DFZ foi isolado e identificado como 21 hidroxideflazacorte, o qual é relatado como seu metabólito ativo.

- O DFZ e o 21 hidroxideflazacorte demonstraram efeito antiinflamatório *in vivo* e *in vitro*.
- O 21-hidroxideflazacorte pode ser um produto de degradação qualificado, de acordo com ICH 2006, visto que estudos comprovam que este é o principal metabólito ativo do DFZ.
- Quatro (F1, F2, F3 e F4) das 18 formulações avaliadas no desenvolvimento da suspensão de uso oral apresentaram resultados adequados nos testes centrifugação, característica do sobrenadante e tempo de ressuspensão após a centrifugação, e foram selecionadas para realização de estudo de estabilidade.
- As formulações F1 e F2, contendo o polímero aniônico CMC-Na, foram mais estáveis que as formulações F3 e F4, contendo o polímero não-iônico HPMC.
- A formulação F1 foi considerada mais estável devido à manutenção de todos os parâmetros dentro dos limites de 5 %, conferindo um prazo de validade de 24 meses.
- A formulação F2 apresentou todos os parâmetros dentro dos limites de 5% exceto a perda de peso que ficou entre 5 e 10 %, conferindo um prazo de validade de 12 meses.
- As formulações F3 e F4 foram consideradas instáveis.

PERSPECTIVAS

Em função dos estudos realizados, novas perspectivas surgiram para aprofundar as pesquisas com deflazacorte.

Estudos das propriedades do estado sólido e velocidade de dissolução intrínseca do Deflazacorte, oriundos de diversos fabricantes, serão realizados em colaboração com a Prof. Dra. Silvia Cuffini.

Como já visto nos resultados o principal produto de degradação (21-hidroxideflazacorte) degrada em outro produto (DDP3). Em função disto surge uma nova perspectiva, de isolar e identificar este produto.

O DFZ, conforme estudo demonstrado por Cuffini et al (2007), pode ser degradado na presença de luz. O isolamento e identificação destes produtos de degradação são importantes, visto que formas farmacêuticas podem estar submetidas à luz. Além disso, estudos farmacológicos destes produtos de degradação podem contribuir para avaliação da segurança desse fármaco. Ensaios de toxicidade e avaliação da atividade antiinflamatória poderão ser realizados.

Para um estudo da formulação F1 é importante a realização de outros ensaios:

- Caracterização: viscosidade, determinação de tamanho de partícula, potencial zeta e desenvolvimento do teste de dissolução.
- Estudo de estabilidade em outras temperaturas para determinação da cinética de degradação do fármaco.
- Realização de estudos de fotoestabilidade.
- Avaliação da atividade antiinflamatória, através de ensaios *in vivo*.

Estas perspectivas deverão ser alvo de estudo para o projeto de doutorado.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, Z. Particle adsorption and deposition: role of electrostatic interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100, p. 267-347, 2003.
- ALLEN, L.V. Dosage form design and development. *Clinical Therapeutics*, v. 30, p.2102-2111, 2008.
- AMIN, M.I.; BRYAN, J.T. Kinetics and factors affecting stability of methylprednisolone in aqueous formulation. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 62, p.1768–1771, 1973.
- ANGELINI, C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. **Muscle Nerve** v.4, p. 424-435, 2007.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 776p.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista DCB 2007**, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/index.htm>. Acesso em 15.08.08
- ARBOLEYA, J.; WILDE, P.J. Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 485–491, 2005.
- ATTWOOD, D. **Sistemas Dispersos**. In: AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. P.85-111.
- AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 200. 677p.
- BERNAREGGI, I.A.; POLETT P.; ZANOLO, G.; ZERILLI, L.F. Simultaneous determination of the two main metabolites of deflazacort in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.5, p. 177-181, 1987.
- BIGGAR, W.D.; GINGRAS, M., FEHLINGS, D.L.; HARRIS, V.A.; STEELE, C.A. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparasion of two different protocols. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 476 - 482, 2004.
- BIGGAR, W.D.; HARRIS, V.A.; ELIASOPH, L.; ALMAN, B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, p. 249 - 255, 2006.
- BOLING, E.P. Secondary Osteoporosis: Underlying Disease and the risk for glucocorticoid-induced ostoporosis. **Clinical Therapeutics**, v. 26, pag.1 - 14, 2004.
- BRASIL, Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade, **Diário Oficial União**, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em < <http://e->

legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word=#'. Acesso em: 18.04.2007.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, **Diário Oficial União**, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 19.03.2007.

BROWN, M.E., ANTUNES, E. M., GLASS B.D., LEBETE, M., WALKER, R.B. DSC screening of potential prochlorperazine-exciptent interactons in the preformulation studies. **Journal of Thermal Analyses and Calorimetry**, v.56, p. 1317- 1322, 1999.

BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 1482–1503, 2007.

BUNDGAARD, H., HANSEN, J. Studies on the stability of corticosteroids VI. Kinetics of the rearrangement of betamethasone 17-valerate to the 21-valerate ester in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**. 7, 197–203. 1981

BYLLANY, M. **Suspensões e Emulsões**. In: AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.341-364.

CANCELA, M.A.; A LVAREZ, E.; MACEIRAS, R. Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 419–424, 2005.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and practices**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2000. 773p.

CLAESSENS E VAN STRATEN H.A., VAN STRATEN M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 23-41, 2004.

CLUCZARC, E.W. Validação de Métodos em Espectroscopia para Análises Farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**. v. junho, p. 22-28, 1998.

COHEN, D., ADACHI, J.D. The treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 88, p. 337-349, 2004.

CORRÊA, G.M. **Deflazacort: Desenvolvimento e validação de metodologia de análise e estudos de dissolução de comprimidos e cápsulas manipuladas**. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

CORRÊA, G.M., BELLÉ, L.P., BAJERSKI, L., BORGMANN, S.H.M., CARDOSO, S.G. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the

determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Chromatographia**, v. 65, p. 591-594, 2007.

CRAIG, C.R.; SITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna**, 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005, 815 p.

CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS, Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; FILHO, M.J.; MONTI, G.A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v.72, p. 261-269, 2007.

DURO, R.; ALVAREZ, C.; MARTINEZ-PACHECO, R.; GOMEZ-AMOZA J.L., CONCHEIRO, A.; SOUTO, C. The adsorption of cellulose ethers in aqueous suspensions of pyrantel pamoate: effects on zeta potential and stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 181–188, 1998.

FALKIEWICZ, M. J. Theory of Suspensions. In LIEBERMAN, H. L.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. 2. ed. vol. 1. New York: Hardcover, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo:Atheneu, 1988.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/ob/default.htm>>. Acesso em 13 de agosto de 2007.

FERRARIS, J.R.; SORROCHE, P.; LEGAL, S.; OYHAMBURU, J.; BRANDI, P.; PASQUALINI, T. Effect of therapy with deflazacort on dyslipoproteinemia after pediatric renal transplantation. **The Journals of Pediatrics**, v. 133, p.533-535, 1998.

FERRRARIS, J.R.; PASQUALINI, T.; ALONSO, G.; LEGAL, S.; SORROCHE, P.; GALICH, A.M.; JASPER, H. Effects of deflazacort vs. Methylprednisone: a randomized study in kidney transplant patients. **Pediatric Nephrology**, **5**, 734-741, 2007.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 732p.

FORD, J.L., TIMMINS, P. **Pharmaceutical thermal analysis: technique and application**. New York: Willey interscience, 1989. 313p.

FREY, B.M., FREY, F.J. Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. **Clin Pharmacokinet**. v.19, p. 126-46, 1990.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia Clínica**, 3^a Ed, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 1074p.

GALICHET, L.Y. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, Published by the Pharmaceutical Press, 2006, on line. Disponível em <http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke's/current>>. Acesso em: 10.03.2007.

GALLARDO, V.; MORALES, M.E.; RUIZ, M.A.; DELAGDO, A.V. An experimental investigation of the stability of ethylcellulose latex. Correlation between zeta potential and sedimentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 170-175, 2005.

GENNARO, A.R. Remington. **A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 1022 p.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 12-17, 2007.

GÖRÖG, S. Recent advances in the analysis of steroid hormones and related drugs. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 67-82, 2004.

GÖRÖG, S. The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p.931-937, 2005.

ICH – Impurities in New Drug Products Q3B(R2), **International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use**, 2006.

ICH - Stability testing of new drug substances and products. **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q1A(R2)**, 2003.

ICH - Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), **International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use**, 2005.

IFA D.R.; MORAES M.E.; MORAES M.O.; SANTAGADA V.; CALIENDO G.; DE NUCCI G. Determination of 21-hydroxydeflazacort in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 440-445, 2000.

JOHNSON, K., AMIDON, G.L., POGANY, S. Solution kinetics of a water-soluble hydrocortisone prodrug: hydrocortisone-21-lysinate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 87–89, 1985

KIBBE, A.H **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3 ed. London: Pharmaceutical Press, United Kingdom, 2000, 928p.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, 2001. p.1517.

LIPPUNER, K.; CASEZ, J.P.; HORBER, F.F.; JAEGER, P. Effects of deflazacort versus prednisone on bone mass, body composition, and lipid profile: a randomized, double blind study in kidney transplant patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 3795 - 3802, 1998.

LONGUI, C.A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria.** v. 83, p.163-177, 2007 .

LÖWENBERG, M. VERHAAR, A.; BRINK, G.R.; HOMMES, D.W. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, p. 158-163, 2007.

MAUGER, J.W.; PARUTA, A.N.; GERRAUGHTY, R.J. Consecutive first-order kinetic consideration of hydrocortisone hemisuccinate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 574–578, 1969.

MENDAHAM, J.; DENNEY R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Análise Química Quantitativa.** 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002, 462p.

MEZDOUR, S.; CUVELIERA, G.; CASHB, M.J.; MICHONA, C. Surface rheological properties of hydroxypropylcellulose at air–water interface. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 776–781, 2007.

NBR ISO/IEC 17025. **Associação Brasileira de Normas Técnicas.** Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2ª ed., Rio de Janeiro, 2005.

O'Neil, M. J. **The Merck Index.** 14 ed. New York: Merck &co.2006, 2520p.

OMOTE, M.; SAKAI, K.; MIZUSAWA, H. Acute effects of deflazacort and its metabolite 21-desacetyl-deflazacort on allergic reactions. **Arzneimittelforschung**, v. 44, p. 149-53, 1994.

OZKAN, Y.; SAVASER, A.; TAS, C.; USLU, B.; OZKAN, S A. Drug Dissolution Studies and Determination of Deflazacort in Pharmaceutical Formulations and Human Serum Samples by RP-HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, p.2141 - 2156, 2003.

PAWLIK, M. Polymeric dispersants for coal-water slurries. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 266, p. 82-90, 2005.

PEREZ, O.E.; SANCHEZ, C.C.; PILOSOFA, A.M.R.; PATINO, J.M.R. Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air–water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 387–402, 2008.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216 - 224, 2007.

POUTON, C.W. Formulation of Poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 278-287, 2006.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnica farmacêutica e farmácia galenica. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. 2548p.

RAGHAVAN, S.L.; SCHUESSEL, K.; DAVIS, A.; HADGRAFT, J. Formation and stabilization of triclosan colloidal suspensions using supersaturated systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 261, p. 153–158, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. 703p.

REYNOLDS D.L., BURMASTER S.D., EICHMEIER L.S. Quantitative determination of 21-hydroxy-deflazacort in human plasma using gradient semi-microbore liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 8, p. 230-235, 1994.

SAHASRANAMAN, S.; ISSAR M.; T´OTH G.; HORV´ATH G.; HOCHHAUS G. Characterization of degradation products of mometasone furoate. **Pharmazie**, v. 71, p.59 - 367–71, 2004.

SANTOS-MONTES, A.; GONZALO-LUMBRERAS, R.; GASCO-LOPES, A.I.; ISQUIERDO-HORNILLOS, R. Extraction and High-performance liquid chromatographic separation of Deflazacort and its metabolite 21-hydroxydeflazacort. Application to urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 657, p.248 - 253, 1994.

SANTOS-MONTES, A.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R.; Optimization of separation of a complex mixture of natural and synthetic corticoids by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate. Application to urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 724, p. 53 - 63, 1999.

SHÄCKE, H.; DÖCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 96, p. 23-43, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7^a ed, Hoboken, NJ: Editora John Wiley, 2005. 502p.

SINGH, B.P.; MENCHAVEZ, R.; TAKAI, C. FUJI, M.; TAKAHASHI, M. Stability of dispersions of colloidal alumina particles in aqueous suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 291, p.181-186, 2005.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology v. abril**, p. 1-14, 2000. On line, disponível em: http://levimik.club.fr/div_PharmTech_stresstest.pdf. Acesso em: 16/05/2007.

SKOOG D.A.; HOLLER, J.F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 Ed. São Paulo: Artmed, 2002. 836p.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 3, p. 12-20, 1998.

SWEETMAN, S. MARTINDALE: **The Complete Drug Reference**. The Pharmaceutical Press, 2007, on line

<<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current>>. Acesso em 10.03.2007.

TENG, W.X., CUTLER, D.C., DAVIES, N.M., Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 259, p. 129–141, 2003.

TKACHENKO, N. H.; YAREMKO, Z. M.; BELLMANN, C.; SOLTYS, M. M. (c) The influence of ionic and nonionic surfactants on aggregative stability and electrical surface properties of aqueous suspensions of titanium dioxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, p. 686-695, 2006.

TKACHENKO, N.H.; YAREMKO, Z.M.; BELLMANN, C. (a) Effect of 1-1-charged ions on aggregative stability and electrical surface properties of aqueous suspensions of titanium dioxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, p. 10-19, 2006.

TKACHENKO, N.H.; YAREMKO, Z.M.; BELLMANN, C.; SOLTYS, M.M. (b) Influence of poly (methacrylic acid) on aggregative stability and electrical surface properties of aqueous suspensions of titanium dioxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, p. 149-158, 2006.

TRIPHATI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5ª ed., Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006. 774p.

USP - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 29 ed. Rockville, Unites States Convention, 2005.

VILA JATO, J.L **Tecnologia Farmacêutica**, Ed.Sintesis, Madrid, Espanha.1997. 623p.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 3-26, 2001.

VOIGT, R. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. Espanha. Editorial Acribia. 1982, 769p.

WATERMAN, K.C., ADAMI, R.C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, 101-125, 2005.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**, Ed. Churchill Livingstone, Glasgow, UK,1999. 337p.

YANG, X. H.; ZHU, W. L. Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. *Cellulose*, v. 14, p. 409–417, 2007.

YAPAR, D., DAL, A.G., TUNCEL, M., UYSAL, U.D. Validated Method for the Determination of Deflazacort by a Flow-Injection Analysis with UV Detection: Application to Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**, v. 27, p. 2593-2601, 2004.

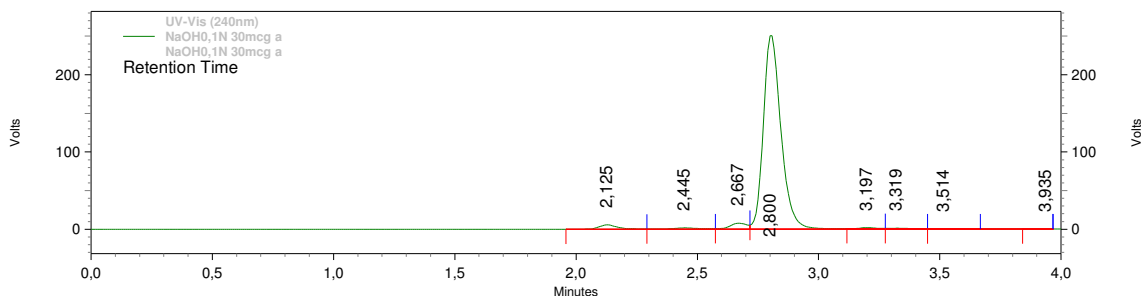
YASAR, F.; TOGRUL, H.; ARSLAN, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 187-199, 2007.

YASUEDA, S.; INADA, K.; MATSUHISA, K.; TERAYAMA, H.; OHTORI, A. Evaluation of ophthalmic suspensions using surface tension. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 377–382, 2004.

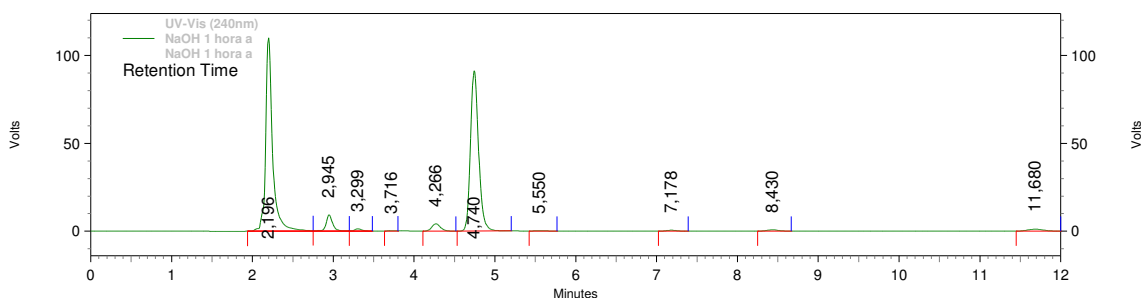
ZHAO, L., LI, P. Developing Early Formulations: Practice and Perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 341, p. 1-19, 2007.

APÊNDICES

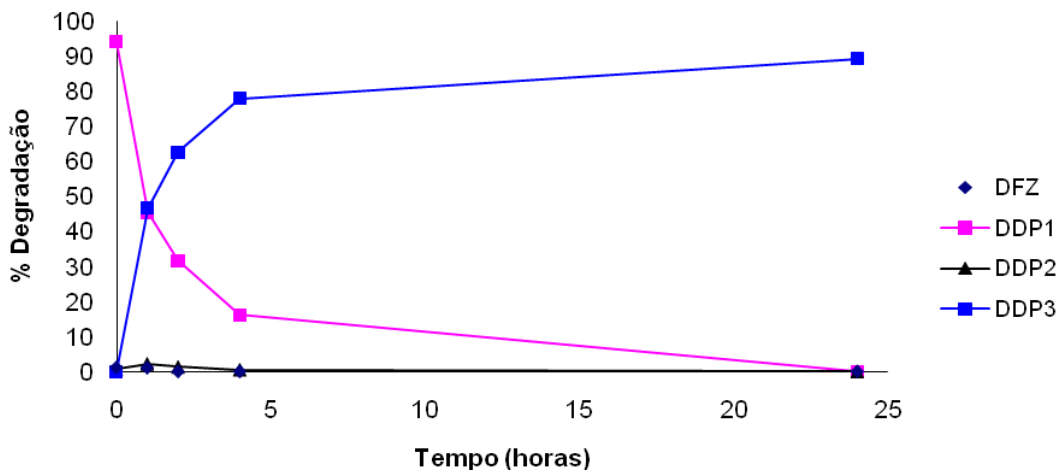
APÊNDICE A – Cromatograma dos produtos de degradação do DFZ, após hidrólise alcalina (NaOH 0,1N, tempo zero). Condições cromatográficas: coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm x 4 µm); fase móvel constituída de acetonitrila:água (80:20 (V/V)), fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 240 nm.



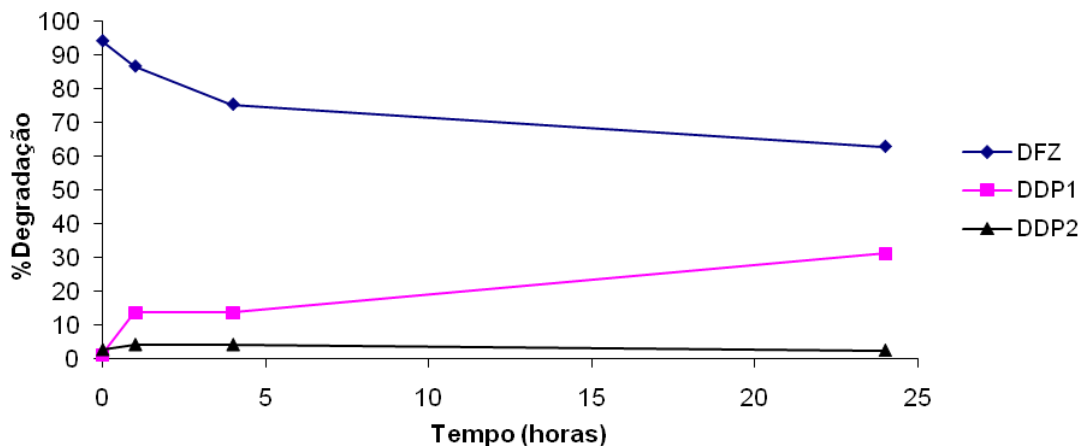
APÊNDICE B – Cromatograma da hidrólise alcalina do DFZ em NaOH 0,1N, após 1 hora . Condições cromatográficas: coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm x 4 µm); fase móvel constituída de acetonitrila:água (60:40 (V/V)), fluxo de 1,0 ml min⁻¹ e detecção em 240 nm.



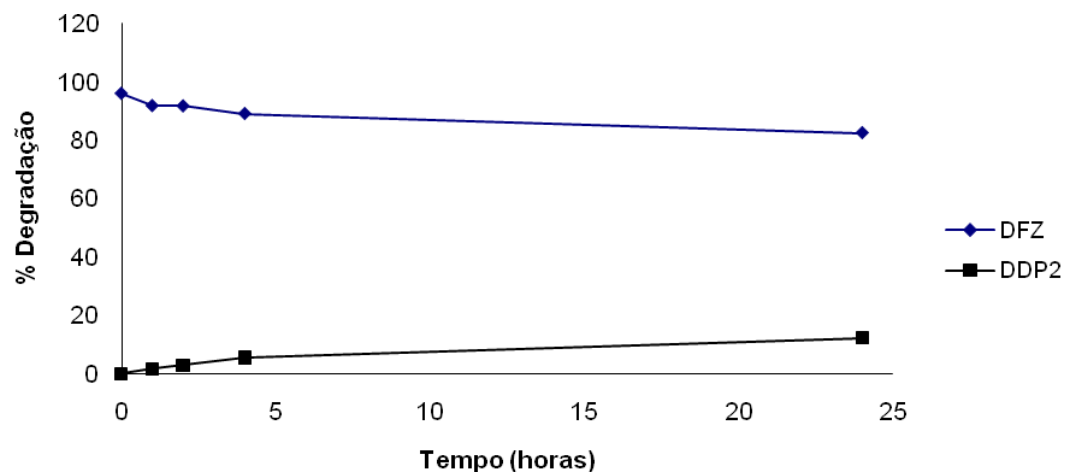
APÊNDICE C – Quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em meio alcalino (NaOH 0,1N), no intervalo de tempo de 24 horas.



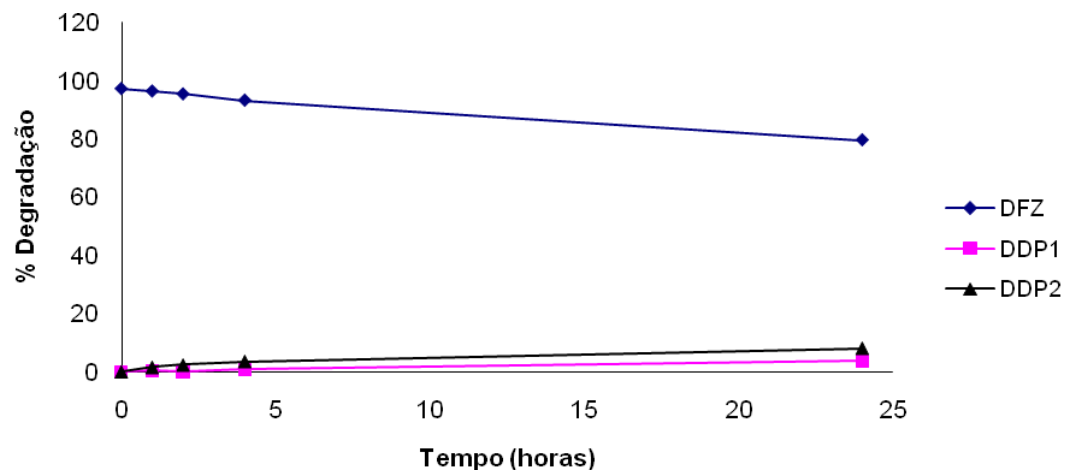
APÊNDICE D – Quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em meio ácido (HCl 0,1N), no intervalo de tempo de 24 horas.



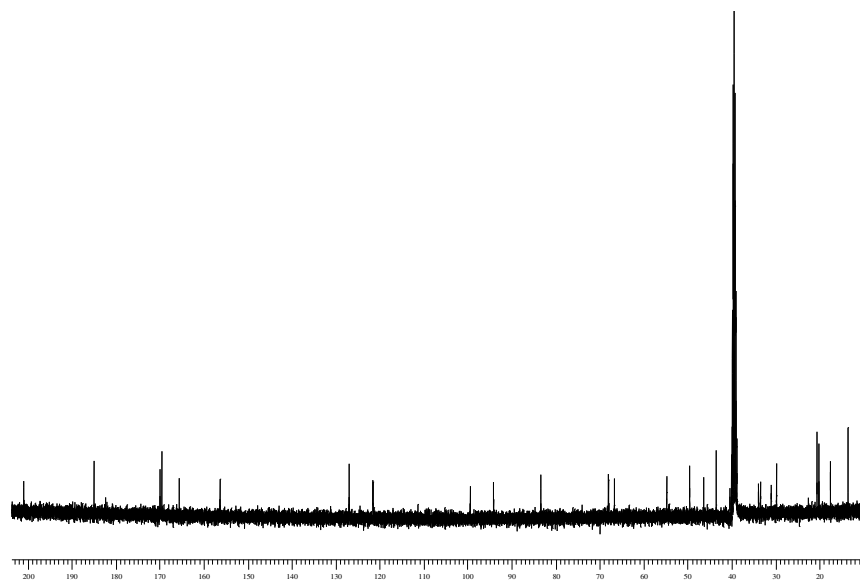
APÊNDICE E – Quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em tampão acetato (pH 5,0), no intervalo de tempo de 24 horas.



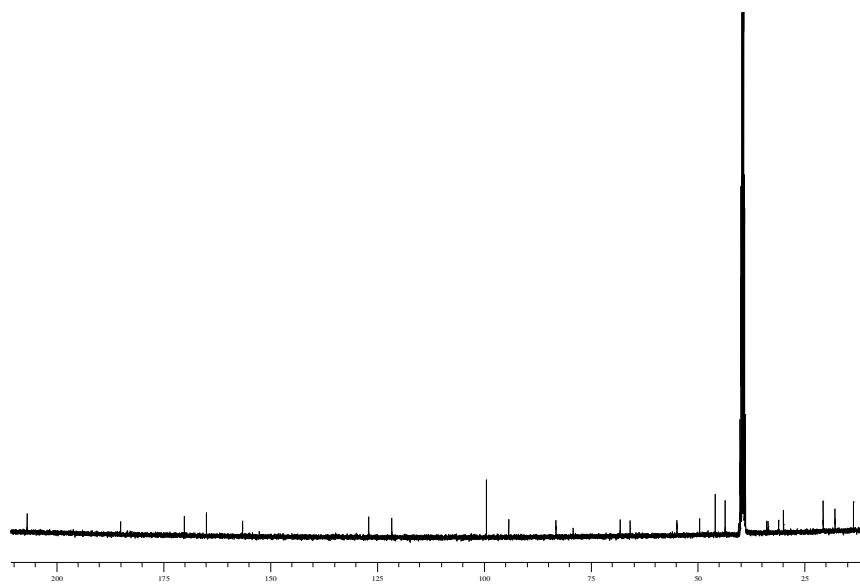
APÊNDICE F – Quantificação dos produtos de degradação do DFZ formados em tampão fosfato (pH 6,8), no intervalo de tempo de 24 horas.



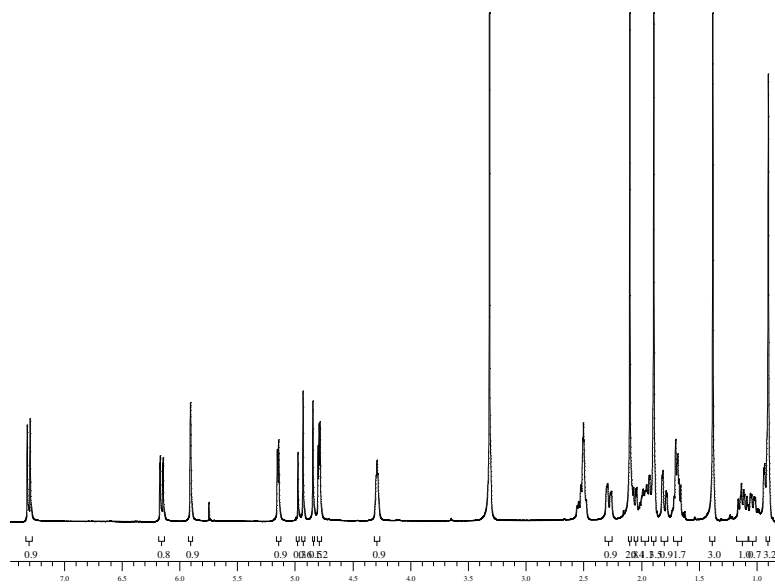
APÊNDICE G – Espectro de RMN¹³C do DFZ obtido em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd₆ como solventes.



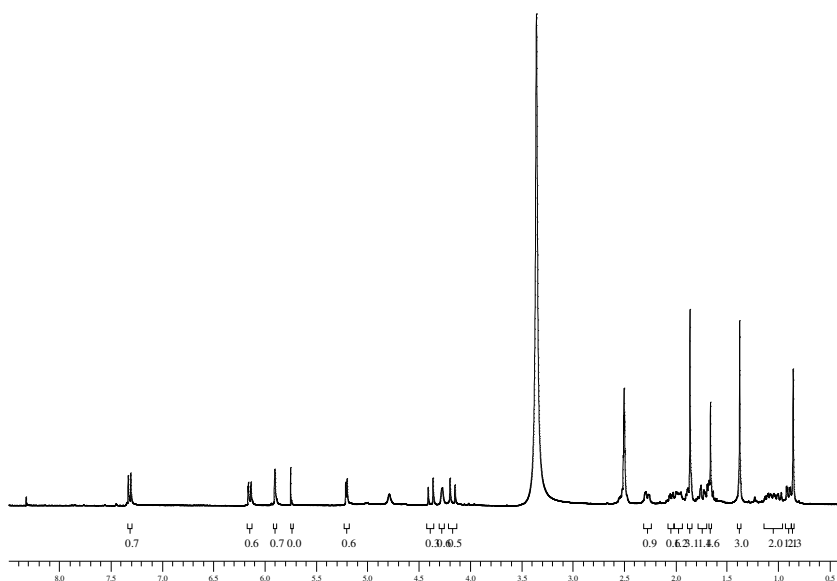
APÊNDICE H – Espectro de RMN¹³C do DDP1 obtido em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 400 MHz, utilizando DMSO/MeOHd₆ como solventes.



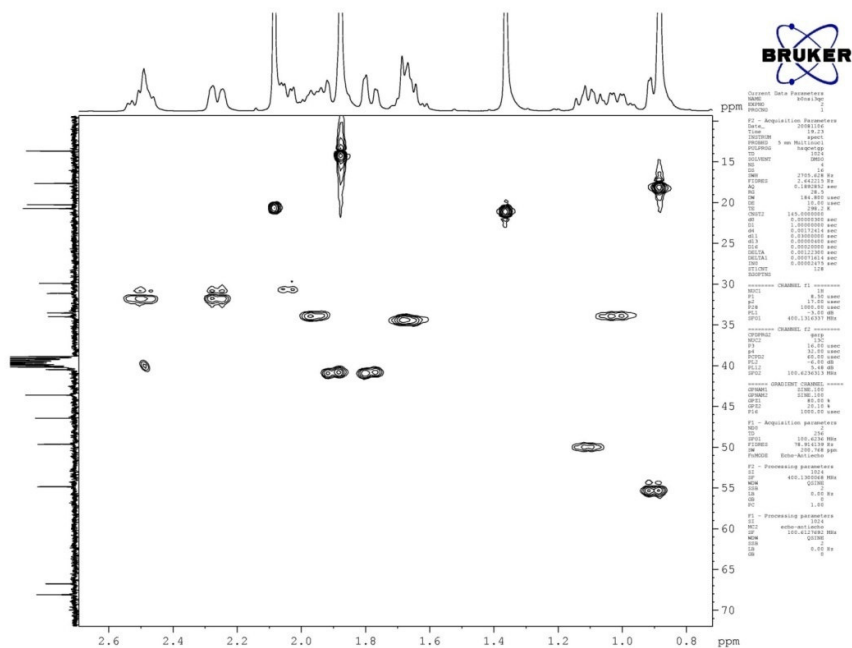
APÊNDICE I – Espectro de RMN ^1H de DFZ obtido em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 100 MHz, utilizando DMSO/MeOH*d*6 como solventes.



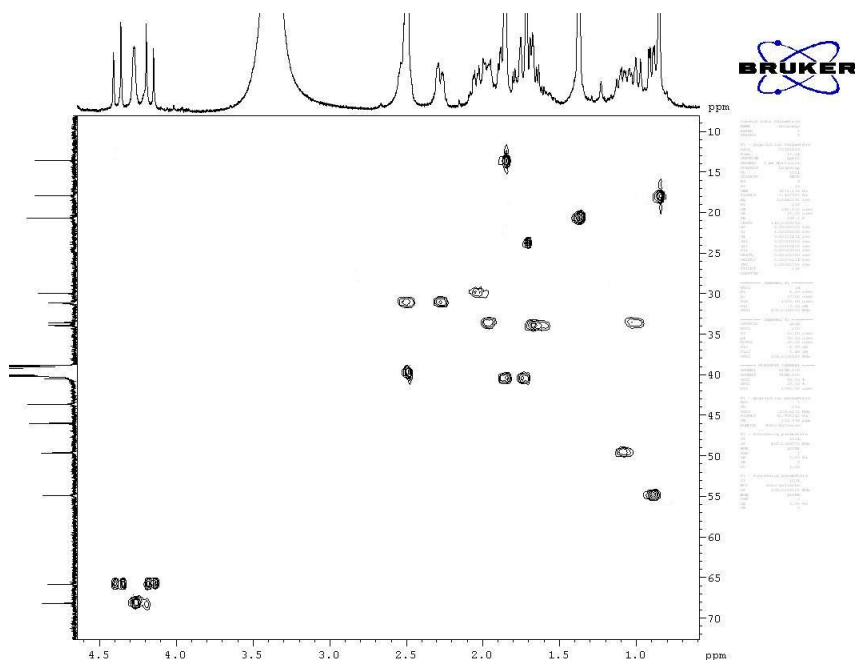
APÊNDICE J – Espectro de RMN ^1H de DDP1 obtido em espectrofotômetro Bruker DPX 400, registrado a 100 MHz, utilizando DMSO/MeOH*d*6 como solventes.



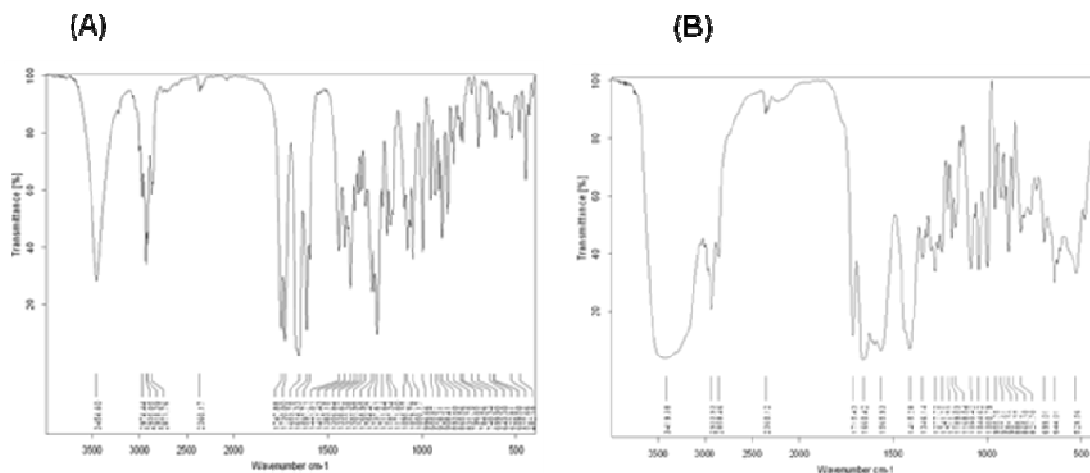
APÊNDICE K - HMQC: Expansão da região das metilas do Deflazacorte.



APÊNDICE L - HMQC: Expansão da região das metilas do Produto degradado DDP1.



APÊNDICE M – Espectro do DFZ (A) e DDP1 (B) na região do infravermelho, realizado em espectrofotômetro IR, Shimadzu FT-IR spectrometer, utilizando pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo a amostra na concentração de 1 %.



APÊNDICE N – Espectro de massa do DFZ (A) e DDP1 (B) utilizando cromatógrafo ESI-MS/MS Micromass Waters Q-TOF com as seguintes condições: temperatura 100 °C, 300 °C; voltagem capilar +3000 V, cone +40 V, gás de nebulização nitrogênio e gás de colisão argônio, com colisão de 30 V.

