

Cassiana Mendes

**EMPREGO DE ESTRATÉGIAS PARA A MELHORIA DAS  
PROPRIEDADES BIOFARMACÊUTICAS DA  
HIDROCLOROTIAZIDA E NORFLOXACINO: FORMAÇÃO DE  
COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mendes, Cassiana

Emprego de estratégias para a melhoria das propriedades  
biofarmacêuticas da hidroclorotiazida e norfloxacino:  
formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas /  
Cassiana Mendes ; orientador, Marcos Antônio Segatto  
Silva ; co-orientador, Paulo Renato de Oliveira. -  
Florianópolis, SC, 2013.  
183 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. I. Silva, Marcos Antônio Segatto . II.  
Oliveira, Paulo Renato de. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.  
Título.

**“Emprego de estratégias para a melhoria das propriedades biofarmacêuticas da hidroclorotiazida e norfloxacino: Formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas”**

**POR**

**Cassiana Mendes**

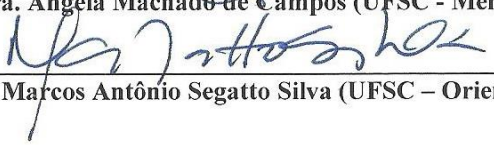
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami (UFPR – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Pedro Manique Barreto (UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ângela Machado de Campos (UFSC - Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva (UFSC – Orientador)**

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da**  
**UFSC**

**Florianópolis, 29 de novembro de 2013.**



Dedico este trabalho aos meus pais,  
por serem porto seguro e exemplos de amor e vida.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por sempre nos fazer escolher o melhor caminho.

Ao meu eterno Professor Marcos Segatto, que apesar de não gostar da denominação orientador, foi o responsável por minha orientação acadêmica e humana, além de sempre acreditar no meu trabalho mesmo quando eu desconfiava. Zuco, nunca esquecerei toda a cumplicidade e luta em minha defesa.

Aos meus pais, Elisabeth e Ildemar, por todo incentivo, apoio, paciência, preocupação, atenção, enfim, por serem tudo pra mim. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

A toda minha família que mesmo a grande distância não foi capaz de alterar todo o carinho e amor dedicado por vocês, Rafael, Luciana e o mais novo *petit* Arthur.

Ao meu bem, por toda paciência e amor dedicados de várias formas e pelo crescimento e aprendizado juntos. O que nós temos é tão nosso que ninguém precisa entender e nem pode tirar isso de nós.

Ao meu Coorientador Paulo, que formalmente tem essa denominação, mas pra mim você fez tantos papéis na minha vida, de orientação, de um ombro amigo, de um ouvido para eu poder “chorar as pitangas”, de confiança e de muitas risadas. Obrigada por tudo! Inclusive de trazer uma amiga linda, essa alegria ambulante, que é a Lari para as nossas vidas.

À família que eu escolhi ter: 1ª. Nakita e Tábata, que Rio do Sul trouxe cuja amizade supera qualquer distância, tempo ou crise adolescente. 2ª. Minha querida Ana, a Farmácia me deu a oportunidade de reconhecer a fraternidade em você, porque a gente é isso, essa conexão que foge da nossa base científica, só pra nos contradizer. 3ª. Silvinha, minha piolha do coração, nós vivemos uma das melhores épocas das nossas vidas juntas, e muitas ruins também, posso afirmar que “sopa” que nem você não existe! 4ª. Lolô, a irmã que a nossa linda Coimbra me deu, irmandade que as pessoas foram capazes de reconhecer antes mesmo de nós, devíamos estar ocupada em algum lugar da Elísio de Moura nessa hora pra não percebermos isso, minha Heloquiza amada.

Às minhas ICs lindas, Bárbara e Aline, como tive sorte de poder contar com dois braços direitos! Sem falar de toda amizade, admiração e cumplicidade que se estabeleceu. Obrigada Bazinha e Line!

Aos amigos que ultrapassam as paredes do laboratório, que época feliz quando tínhamos todos reunidos, o Fábio (japa), Bruno (animal) e meu fiel escudeiro Rafa (guy). Se eu tivesse noção na época nem teria reclamado tanto das “pegações de pé”.

A todos meus amigos e colegas de laboratório, Chari, Gabi, Monika, Amarilis, Ana, Camila, Cinira, Andrea C.R., Andrea M., Andrea G., Gis, Manoela, Vivi, Thaís, Mariha, Sana e Paola do LabCQ e Mari (nega), Luís, Talitha e André da Farmacotécnica, Didi, Carol, Vitor, Solomon e Carlos da Gnosia. Vocês não tem ideia o quanto ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional.

Às professoras Simone, Hellen e Sílvia Cuffini, por todas as conversas, opiniões e amizade.

Ao professor Francisco Veiga por toda oportunidade e ensinamento.

Aos professores Adailton Bortoluzzi, Pedro Barreto, Tânia Bresolin, Andrea Adams, Cláudia Simões, Flávio Reginatto e aos alunos Jadel, Ana Paula e Karla, por toda colaboração e ajuda para realização dos experimentos.

Ao CNPq, CAPES, PGFar e UFSC, pelo todo apoio financeiro e por possibilitar a realização deste trabalho.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para a realização deste sonho.



*Continue a nadar, continue a nadar...*

*Dori, Procurando Nemo.*



## RESUMO

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, fármacos classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade, comprometendo sua biodisponibilidade. As ciclodextrinas são oligossacarídeos que fornecem uma cavidade hidrofóbica capaz de englobar fármacos na forma de complexos de inclusão fármaco-hospedeiro, carreando as moléculas hidrofóbicas “hóspedes” em solução até as membranas celulares, melhorando sua solubilidade e facilitando sua absorção. No presente projeto, objetivou-se a avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica de suspensões pediátricas extemporâneas contendo anti-hipertensivos (furosemda, espironolactona e hidroclorotiazida), bem como o desenvolvimento de complexos de inclusão entre ciclodextrina e fármacos classe IV (hidroclorotiazida e norfloxacino). Nas suspensões pediátricas avaliadas, apenas a suspensão de hidroclorotiazida apresentou problemas de estabilidade química devido à hidrólise do fármaco. Uma solução simples de ajuste de pH para 3,3 foi proposta como alternativa rápida e viável em nível hospitalar. Foram desenvolvidos complexos de inclusão entre ciclodextrina e hidroclorotiazida a fim de aumentar a estabilidade do fármaco, bem como suas características de solubilidade e permeabilidade. Diferentes metodologias de preparação (coevaporação, malaxagem, liofilização e *spray-drying*) foram aplicadas, sendo que a inclusão do fármaco na ciclodextrina, a melhora da solubilidade e permeabilidade foram comprovadas por diversas técnicas analíticas. Complexos de inclusão entre norfloxacino e ciclodextrina foram preparados por diferentes técnicas, obtendo-se melhora da solubilidade do fármaco e aumento na atividade microbiológico *in vitro*. O presente trabalho fornece um completo estudo de desenvolvimento, obtenção e caracterização de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e fármacos classe IV. Estes complexos surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de novas formulações com aumento dos benefícios terapêuticos da hidroclorotiazida ou norfloxacino. Esta nova formulação poderá possibilitar a diminuição da dose e, por conseguinte, redução de efeitos colaterais, aumento da adesão do paciente ao tratamento, além do benefício econômico em longo prazo.

Palavras-chave: suspensões pediátricas, estabilidade físico-química e microbiológica, hidroclorotiazida, norfloxacino; ciclodextrina; complexos de inclusão; solubilidade, permeabilidade, atividade antimicrobiana.



**ABSTRACT**  
**STRATEGIES TO IMPROVE HYDROCHLOROTHIAZIDE AND**  
**NORFLOXACIN BIOPHARMACEUTICAL PROPERTIES:**  
**CYCLODEXTRINS INCLUSION COMPLEXES**

According to the Biopharmaceutics Classification System, class IV drugs are considered to present low solubility and low permeability, which will compromise the bioavailability. Cyclodextrins are oligosaccharides that provide a hydrophobic cavity to encapsulate the drug in the form of a host-guest complex. They act as carriers by keeping the drug molecules in solution and delivering them to the surface of the biological membrane, where the drug will be absorbed. The present study aimed at assessing the physicochemical and microbiological stability of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use (furosemide, spironolactone and hydrochlorothiazide) besides the inclusion complexes development between cyclodextrins and class IV drugs (hydrochlorothiazide and norfloxacin), in an attempt to improve the biopharmaceutical properties. At the pharmaceutical suspensions evaluated, only the hydrochlorothiazide pharmaceutical formulation demonstrated poor chemical stability due to drug hydrolyses. The formulation was optimized by adjusting the pH to 3.3, a fast and practicable solution to the hospital environment. Inclusion complexes between hydrochlorothiazide and cyclodextrins were, furthermore, developed to improve the drug stability likewise, solubility and permeability properties. Different methods (co-evaporation, kneading followed by freeze-drying or spray-drying) were investigated and guest–host interactions were evaluated through a complete physicochemical characterization to prove the inclusion complex formation and the enhanced of solubility and permeability. In the same way, inclusion complexes between cyclodextrin and norfloxacin were prepared by different techniques and the solubility and microbiological activity were enhanced. Pharmaceutical actives well recognized can be profit by the cyclodextrins technology which the improvement of the biopharmaceutical properties. The present work provides a complete study that encompasses development, production and characterization of inclusion complexes between cyclodextrins and class IV drugs. These inclusion complexes arise as an alternative to the novel pharmaceutical development with the hydrochlorothiazide and norfloxacin therapeutics benefits. This new pharmaceutical formulation can, therefore, maximize and facilitate drug oral absorption, reducing the oral dosage required, which will reduce the side effects and increase the patient compliance, besides providing a long-term economic benefit.

Keywords: pediatric suspensions, physicochemical and microbiological stability, hydrochlorothiazide, norfloxacin, cyclodextrins, inclusion complexes, solubility, permeability, microbiological activity.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Sistema de classificação Biofarmacêutica como definido por Amidon e colaboradores (1995). Fonte: adaptado de Smetanová (2011)....	35
Figura 2. Estrutura química da hidroclorotiazida.....	38
Figura 3. Transporte de íons no túbulo distal, mostrando o local de ação da HCTZ, diurético tiazídico. C1 representa o sistema de cotransporte de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup> . C2 representa o cotransporte eletroneutro de K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> . E P representa a bomba de sódio. Fonte: adaptado de Rang e colaboradores (2012).....	39
Figura 4. Estrutura química do norfloxacinó.....	42
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação das quinolonas. (a) Ligação da girase com o ADN. Formação reversível de complexos fármaco-enzima-ADN que rapidamente bloqueiam a replicação do ADN. (c) Inibição da replicação leva a indução da resposta bacteriana e filamentação celular. (d) Fragmentação letal do cromossomo que requer síntese proteica em condições aeróbias. (e) Fragmentação letal do cromossomo que requer síntese proteica, mas não condições aeróbias. (f) Fragmentação letal do cromossomo que não requer nem síntese proteica nem condições aeróbias. Pontos de interrogação indicam incertezas. Fonte: adaptado de Cheng e colaboradores (2013).....	43
Figura 6. Representação da estrutura química da βCD e sua forma troncocônica da molécula. Fonte: adaptado de Singh (2010).....	46
Figura 7. Estrutura representativa das ciclodextrinas. Fonte: adaptado de Gosh e Nau (2012).....	46
Figura 8. Tipos de diagramas de solubilidade de fase obtidos da formação de complexos de inclusão entre fármacos e CD. Fonte: adaptado de Takahashi (2012).....	52
Figura 9. Equação representativa da formação do complexo de inclusão entre fármaco e CD na proporção molar 1:1.....	52
Figura 10. Esquema do processo de absorção intestinal do fármaco complexado na CD. Fonte: adaptado de Carrier, Miller e Ahmed (2007).....	55

### Capítulo 2

Figura 1. Estrutura química da furosemida (A), espironolactona (B) e hidroclorotiazida (C).....	60
Figura 2. Cromatogramas representativos de (A): formulação de furosemida 1 (FRS-F1); (B): formulação de espironolactona 1 (SPR-F1); (C): formulação de hidroclorotiazida 1 (HCTZ-F1); (D): formulação de	

hidroclorotiazida 2 (HCTZ-F2) após 7 dias. AB: aminoclorobenzenedisulfonamida. MP: metilparabeno; PP: propilparabeno; SC: sacarina sódica.....	68
Figura 3. Reação de hidrólise da hidroclorotiazida (HCTZ) em meio básico gerando o produto aminoclorobenzenodisulfonamida (AB). Fonte: adaptado de Mollica e colaboradores (1971).....	70
Figura 4. Gráficos da distribuição do tamanho de partículas dos fármacos na formulação de furosemida 1 (FRS-F1), formulação de espironolactona (SPR-F1), formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2), realizados após preparação e após 7 dias de armazenamento.....	73

### Capítulo 3

Figura 1. Estrutura representativa das ciclodextrinas. Fonte: adaptado de Venturini e colaboradores (2008).....	80
Figura 2. Diagrama de solubilidade de fases entre HCTZ e $\gamma$ CD ou HP $\beta$ CD em pH = 3,3 (A), e HCTZ e $\beta$ CD em pH 3,3; 4,5 e 5,5 (B); todos em solução aquosa a temperatura ambiente (25°C).....	89
Figura 3. Representação esquemática da ionização da hidroclorotiazida em diferentes valores de $pK_a$ . Adaptado de Kadam e colaboradores (2011).....	89
Figura 4. Plotagem de variação contínua (método de Job) para o complexo HCTZ: $\beta$ CD (pH 3,3 a 25 °C, 273 nm).....	90
Figura 5. Curvas de DSC obtidas para HCTZ (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C) e diferentes métodos de preparação: coevaporado (D), liofilizado (E), malaxagem seguida de liofilização (F) malaxagem seguida de <i>spray-drying</i> (G).....	92
Figura 6. Curvas de DSC obtida para $\beta$ CD. 1° aquecimento: 30 a 200 °C, 2° aquecimento: 30 a 300 °C.....	92
Figura 7. Ensaio de microscopia com estágio de aquecimento, em que A representa a hidroclorotiazida e A1 é na temperatura de 25 °C, A2 em 264 °C e A3 266 °C. B representa a $\beta$ CD e B1 é na temperatura de 25 °C, B2 em 109 °C e B3 em 121 °C. C representa a mistura física e C1 é na temperatura de 25 °C, C2 em 120 °C e C3 em 266 °C.....	93
Figura 8. Curvas TG obtidas para HCTZ (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C) e complexos obtidos por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida de liofilização (F), malaxagem seguida de <i>spray-drying</i> (G).....	95
Figura 9. Espectro infravermelho obtido para HCTZ .....	97
Figura 10. Espectros infravermelho obtidos para HCTZ (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C), e complexos obtidos por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida de <i>spray-drying</i> (G) .....	98



Figura 11. Representação esquemática do complexo de inclusão HCTZ/ $\beta$ CD, demonstrando a estrutura da HCTZ parcialmente inserida na cavidade da $\beta$ CD.....	98
Figura 12. Difratoogramas obtidos para o HCTZ (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C) e das amostras secas por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida de <i>spray-drying</i> (G).....	100
Figura 13. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o HCTZ (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D) liofilizado (E) malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (G). As fotomicrografias foram obtidas na ordem de magnificação de 200x.....	101
Figura 14. Perfil de dissolução obtido para a HCTZ (A), mistura física (B), coevaporado (C) malaxagem seguida da liofilização (D) e malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (E).....	104
Figura 15. Gráfico representativo da quantidade de HCTZ determinada no estudo de estabilidade química quando as amostras de HCTZ, mistura física (MF) e complexo de inclusão obtido por malaxagem seguido de liofilização (ML) foram armazenadas em tampão intestinal simulado (pH 6,8) durante 7 dias.....	107

#### Capítulo 4

Figura 1. Diagrama de solubilidade de fases de NFX e $\beta$ CD a diferentes valores de pH, e com $\beta$ CD, $\gamma$ CD, e HP $\beta$ CD em pH = 3,0, todos em solução aquosa a temperatura ambiente (25 °C).....	119
Figura 2. Estrutura do NFX com seus respectivos valores de $pK_a$ determinados experimentalmente de cada grupamento químico passível de protonação.....	120
Figura 3. Espectro de fluorescência do NFX em presença de $\beta$ CD (A), $\gamma$ CD (B), e HP $\beta$ CD (C) em solução aquosa a temperatura ambiente (25 °C, pH =3,0). $\lambda_{ex}$ = 330 nm e $\lambda_{em}$ = 445 nm.....	121
Figura 4. Plotagem de variação contínua (método de Job) para o complexo NFX: $\beta$ CD ( $\lambda_{ex}$ = 330 nm, $\lambda_{em}$ = 445 nm, Slit ex/em=15 nm).....	122
Figura 5. Curvas de DSC obtidas para NFX (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C) e diferentes métodos de secagem: vácuo a 80 °C (D), liofilizado (E), coevaporado (F) malaxagem seguida de liofilização (G) malaxagem seguida de <i>spray-drying</i> (H) .....	124
Figura 6. Microscopia com aquecimento obtida do NFX (A), $\beta$ CD (B) e mistura física (C).....	125
Figura 7. Curvas TG obtidas para o NFX (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D), malaxagem seguida de liofilização (E) e malaxagem	

seguida de <i>spray-drying</i> (F).....	126
Figura 8. Espectros de infravermelho obtidos para NFX (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporação (D), malaxagem seguida da liofilização (E) malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (F).....	127
Figura 9. Difratogramas obtidos para o NFX (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C) e das amostras secas por: coevaporação (D), malaxagem seguida da liofilização (E) e malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (F).....	128
Figura 10. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o NFX (A), $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D) malaxagem seguida da liofilização (E) e malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (F). As fotomicrografias foram obtidas na ordem de magnificação de 200x.....	129
Figura 11. Perfil de dissolução obtido para o NFX (A), mistura física (B), coevaporado (C) malaxagem seguida da liofilização (D) e malaxagem seguida do <i>spray-drying</i> (E).....	133
Figura 12. Foto representativa de uma placa do teste de difusão em ágar com delineamento 3x3 para comparação dos halos do NFX e complexo obtido por malaxagem seguida de liofilização (ML). Os números correspondem às três concentrações utilizadas (1-baixa: 10 $\mu$ g/mL, 2-média: 20 $\mu$ g/mL e 3- alta: 40 $\mu$ g/mL).....	134
Figura 13. Espectro de RMN H <sup>1</sup> do complexo NFX/ $\beta$ CD (A), espectro 1D ROESY do complexo NFX/ $\beta$ CD obtido por irradiação seletiva em 3,84 ppm (B) e 3,74 ppm (C) sinais correspondentes ao $\beta$ CD H-3 e H-5, respectivamente.....	136
Figura 14. Representação esquemática do complexo de inclusão NFX/ $\beta$ CD, demonstrando a estrutura do NFX parcialmente inserida na cavidade da $\beta$ CD.....	136

## Apêndice

Figura 1. Cromatograma padrão da HCTZ (A) e HCTZ extraída do complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização.....	172
Figura 2. Cromatograma de degradação obtido para a HCTZ em: (A) HCl 1M, (B) NaOH 0,1M, (C) Água, (D) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20%, (E) exposição à luz UV, (F) exposição à luz VIS.....	173
Figura 3. Representação gráfica da curva de calibração média da HCTZ obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ).....	174
Figura 4. Cromatograma padrão de NFX (A) e NFX extraído do complexo malaxagem seguido de liofilização (B).....	177
Figura 5. Cromatograma de degradação obtido para o NFX em: (A) HCl 1M, (B) NFX descarboxilado, (C) NaOH 1M, (D) Água, (E) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20%, (F)	

luz UV, (G) luz VIS.....	179
Figura 6. Representação gráfica da curva de calibração média do NFX obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).....	180



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Principais propriedades das CDs de origem natural.....46

### Capítulo 2

Tabela 1. Componentes da suspensão aquosa.....63

Tabela 2. Propriedades da formulação de furosemida 1 (FRS-F1), formulação de espironolactona 1 (SPR-F1), formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2, respectivamente).....67

Tabela 3. Porcentagem residual de fármaco na Formulação de furosemida 1 (FRS-F1), Formulação de espironolactona 1 (SPR-F1), Formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2).....69

### Capítulo 3

Tabela 1. Dados do estudo de solubilidade de fases entre HCTZ:βCD 1:1 (M/M). KC (constante de estabilidade), S<sub>0</sub> (solubilidade intrínseca), S<sub>max</sub> (solubilidade máxima), ES (eficiência de solubilidade).....90

Tabela 2. Quantificação da HCTZ na mistura física (MF) e complexos obtidos por coevaporação (COE), liofilização (LF), malaxagem seguida de liofilização (MLF) e malaxagem seguida de spray-drying (MSD).....103

Tabela 3. Resultado dos valores obtidos nas comparações dos perfis de dissolução dos perfis de diferença (*f*<sub>1</sub>) e similaridade (*f*<sub>2</sub>) entre a HCTZ e: mistura física (MF), coevaporado (COE), malaxagem seguida de spray-drying (MS).....105

Tabela 4. Valores de permeabilidade aparente (P<sub>app</sub>) através de células Caco-2 a 37 °C da HCTZ pura, mistura física (MF) ou na forma de complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização (ML).....107

### Capítulo 4

Tabela 1. Quantificação do NFX e caracterização física, química e microbiológica estão descritas abaixo para mistura física (MF) e complexos obtidos por coevaporação (COE), malaxagem seguida de liofilização (MLF) e malaxagem seguida de spray-drying (MSD).....131

Tabela 2. Resultado dos valores obtidos nas comparações dos perfis de dissolução dos perfis de diferença (*f*<sub>1</sub>) e similaridade (*f*<sub>2</sub>) bem como a eficiência de dissolução.....133

## **Apêndice**

Tabela 1. Dados da repetibilidade e da precisão intradias e interdias para HCTZ nos complexos de inclusão.....	175
Tabela 2. Resultado do ensaio de exatidão para a HCTZ.....	176
Tabela 3. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da HCTZ por CLAE.....	176
Tabela 4. Dados da repetibilidade e da precisão intradias e interdias para NFX nos complexos de inclusão.....	180
Tabela 5. Resultado do ensaio de exatidão para o NFX.....	181
Tabela 6. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do NFX por CLAE.....	181

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e UNIDADES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
ADN	Ácido desoxirribonuclêico
AVC	Acidente vascular cerebral
CD	Ciclodextrina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\Delta\text{H}$	Variação de entalpia
Da	Daltons
DPR	Desvio padrão relativo
DRXP	Difração de Raios-X de pó
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FRS	Furosemida
F1	Formulação 1
F2	Formulação 2
FDA	Food and Drug Administration
g/mol	Grama/mol
HCTZ	Hidroclorotiazida
h	Hora
HU	Hospital Universitário
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ITU	Infecção do trato urinário
M	Molaridade
mAU	Mili Absorbance Units (Unidades de absorbância)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
m/m	Massa/massa
M/M	Molar/molar
mPa.s	Milipascal segundo
mV	Milivolts
m/v	Massa/volume
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Efeito Overhauser)

	Nuclear)
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
ROESY	Rotational Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopia do Efeito Overhauser Nuclear nas Coordenadas Girantes)
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Segundo
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SPR	Espironolactona
TG	Termogravimetria
$t_{\max}$	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
UFC	Unidade formadora de colônia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
VIS	Visível



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	29
1.1 OBJETIVOS .....	31
1.1.1 Objetivo geral.....	31
1.1.2 Objetivos específicos.....	31
<b>Capítulo 1: Revisão Bibliográfica</b>	
<b>1. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA</b> .....	35
<b>2. HIDROCLOROTIAZIDA</b> .....	37
<b>3. NORFLOXACINO</b> .....	40
<b>4. CICLODEXTRINAS</b> .....	44
4.1 DEFINIÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS .....	44
4.2 COMPLEXOS DE INCLUSÃO: FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	49
4.3 PROPRIEDADES DAS CICLODEXTRINAS E APLICAÇÃO NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA .....	55
<b>Capítulo 2: Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica de suspensões pediátricas de fármacos anti-hipertensivos produzidas no Hospital Universitário (HU/UFSC)</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	59
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	61
2.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	61
2.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES .....	62
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	63
2.4 PREPARAÇÃO DO PADRÃO E SOLUÇÕES DA AMOSTRA.....	64
2.5 VOLUME DE SEDIMENTAÇÃO .....	64
2.6 REDISPERSIBILIDADE .....	64
2.7 POTENCIAL ZETA.....	65
2.8 TAMANHO DE PARTÍCULA .....	65
2.9 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	65
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	66
3.1 ESTABILIDADE QUÍMICA.....	66
3.2 ESTABILIDADE FÍSICA.....	70
3.2.1 Volume de sedimentação e redispersibilidade.....	71
3.2.2 Potencial zeta.....	71
3.2.3 Distribuição do tamanho de partículas.....	72
3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA .....	74
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	75

**Capítulo 3: Desenvolvimento de complexos de inclusão de hidroclorotiazida e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da permeabilidade**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	79
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	81
2.1 MATERIAIS .....	81
2.2 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASE .....	81
2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NO ESTADO SÓLIDO .....	82
<b>2.3.1 Coevaporação</b> .....	82
<b>2.3.2 Liofilização</b> .....	82
<b>2.3.3 Malaxagem</b> .....	82
2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO .....	83
<b>2.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia com aquecimento e termogravimetria (TG)</b> .....	83
<b>2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)</b> .....	83
<b>2.4.3 Difração de raios-X de pó (DRX)</b> .....	83
<b>2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	84
2.5 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO .....	84
2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	84
2.7 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE HCTZ:BCD .....	85
2.8 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	85
2.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL .....	85
2.10 ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA .....	86
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	87
3.1 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASES .....	87
3.2 INTERAÇÕES ENTRE HCTZ E $\beta$ CD .....	91
<b>3.2.1 Análise térmica</b> .....	91
<b>3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (IV)</b> .....	95
<b>3.2.3 Estudos de difração de raios-X de pó (DRXP)</b> .....	99
<b>3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	100
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS OBTIDOS .....	101
3.5 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS SÓLIDOS .....	102
3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO .....	103
3.7 ESTUDO DE PERMEABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	106
3.8 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE QUÍMICA .....	107
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	108

**Capítulo 4: Desenvolvimento de complexos de inclusão de norfloxacino e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da atividade antimicrobiana**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	111
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	112
2.1 MATERIAIS	112
2.2 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASE	112
2.3 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	113
2.4 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NO ESTADO SÓLIDO	113
2.4.1 Em solução	113
2.4.2 Coevaporação	114
2.4.3 Liofilização	114
2.4.4 Malaxagem	114
2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO	114
2.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia com aquecimento e termogravimetria (TG)	114
2.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)	115
2.5.3 Difração de raios-X de pó (DRX)	115
2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	115
2.6 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO	115
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	116
2.8 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE NFX:BCD	116
2.9 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	117
2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	117
2.11 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	118
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	118
3.1 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASES	118
3.2 ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA	121
3.3 INTERAÇÕES ENTRE NFX E $\beta$ CD	123
3.3.1 Análise térmica	123
3.3.2 Espectroscopia de infravermelho (IV)	126
3.3.3 Estudos de difração de raios-X de pó (DRXP)	127
3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	129
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS OBTIDOS	130
3.5 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS SÓLIDOS	130
3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO	132

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	134
3.8 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	135
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>137</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>141</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>147</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Para a efetividade terapêutica de fármacos oralmente administrados, etapas como dissolução no meio aquoso gastrointestinal e permeação através das membranas celulares são fatores fundamentais e inerentes às substâncias farmacêuticas ativas. Um modelo de predição da administração oral de fármacos foi estabelecido por Amidon e colaboradores e classifica os fármacos segundo suas características de solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal em quatro categorias: classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade). Os fármacos classe biofarmacêutica IV poderão apresentar problemas de biodisponibilidade devido às suas características biofarmacêuticas (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2002; KASIM et al., 2004; CAGNO et al., 2012).

A hidroclorotiazida pertencente à classe IV é um diurético da classe dos tiazídicos que atua sobre o túbulo distal ligando-se ao sítio dos íons cloreto do sistema de cotransporte de sódio, inibindo sua ação e causando natriurese com perda de íons de sódio e cloreto. Atualmente é amplamente utilizada para o tratamento de hipertensão arterial e não apresenta uma forma farmacêutica pediátrica (KOROLKOVAS; FRANÇA; CUNHA, 2006; RANG; RITTER; DALE, 2012).

Na ausência comercial de formulações pediátricas, formas farmacêuticas extemporâneas podem ser preparadas para evitar a quebra de comprimidos que comprometa a administração da dose e eficiência da medicação. Entretanto, mesmo se tratando de formulações extemporâneas, estas devem apresentar comprovação da estabilidade para que possam ser administradas com qualidade, segurança e eficácia (FREED et al., 2005; KAYUMBA et al., 2007; YOON et al., 2009).

Dadas estas premissas, o presente estudo apresenta o controle físico-químico e microbiológico de suspensões pediátricas produzidas no Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina contendo anti-hipertensivos (furosemida, espironolactona e hidroclorotiazida). Ajuste do valor de pH foi realizado para garantia da estabilidade da suspensão de hidroclorotiazida, uma vez que esta apresentou hidrólise do fármaco no pH da formulação (6,5), sendo alterado para pH de maior estabilidade do fármaco (3,3) com uma solução de ácido cítrico.

As ciclodextrinas desde a sua introdução nos anos 50 têm sido consideradas carreadores eficientes de fármacos para melhora das suas propriedades como solubilidade, permeabilidade e estabilidade. Este estudo contempla o desenvolvimento de complexos de inclusão entre

ciclodextrinas e a hidroclorotiazida para correção das suas propriedades biofarmacêuticas inapropriadas.

Fármacos classe SCB IV apresentam problemas significantes em relação à administração oral eficaz. No caso dos antibióticos, doses altas e subsequentes são necessárias e podem propiciar a seleção de microorganismos resistentes diminuindo a aderência do paciente ao tratamento. O norfloxacino é um antimicrobiano classe IV, que da mesma forma que a hidroclorotiazida é objeto de estudo desta dissertação na formação dos complexos de inclusão. O norfloxacino é amplamente utilizado para infecções do trato urinário principalmente em mulheres e idosos devido às suas condições anatômicas mais propícias e a fragilidade do sistema imunológico, respectivamente. Apresenta baixa biodisponibilidade oral e altas doses são necessárias para o tratamento com este fármaco (VILA et al., 2006; BOLON, 2009; BREDA et al., 2009).

Considerando o exposto, o presente trabalho tem o intuito de desenvolver complexos de inclusão entre ciclodextrinas e fármacos classe IV, hidroclorotiazida e norfloxacino. Adicionalmente, é demonstrada uma completa caracterização físico-química dos complexos de inclusão obtidos no estado sólido, estudos de dissolução, permeabilidade e atividade microbiológica *in vitro*. A presente dissertação está dividida em capítulos organizados da seguinte forma: Capítulo 1 – Revisão bibliográfica; Capítulo 2 – Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica de suspensões pediátricas de fármacos anti-hipertensivos produzidas no Hospital Universitário (HU/UFSC); Capítulo 3 – Desenvolvimento de complexos de inclusão de hidroclorotiazida e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da permeabilidade e Capítulo 4 – Desenvolvimento de complexos de inclusão de norfloxacino e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da atividade antimicrobiana. Uma discussão geral foi elaborada visando à contextualização da dissertação no ambiente científico atual bem como a impactação que as alternativas terapêuticas poderão apresentar. Ao final como apêndice o suporte para o desenvolvimento dos capítulos: Apêndice A – Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação da HCTZ e do NFX nos complexos de inclusão por cromatografia líquida de alta eficiência.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliação da estabilidade de formulações pediátricas contendo anti-hipertensivos e o desenvolvimento de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e fármacos classe biofarmacêutica IV, hidroclorotiazida ou norfloxacino.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica de suspensões pediátricas contendo anti-hipertensivos;
- Otimizar a formulação de modo a garantir sua estabilidade;
- Estudar a formação, em solução, de complexos de inclusão de fármaco-ciclodextrina;
- Avaliar a compatibilidade entre o fármaco e as diferentes ciclodextrinas;
- Investigar a obtenção de sistemas sólidos de fármaco-ciclodextrina por diferentes técnicas;
- Desenvolver e validar metodologia cromatográfica para avaliação dos complexos formados;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas dos sistemas sólidos;
- Realizar estudos de dissolução do fármaco puro e nos diferentes sistemas obtidos;
- Avaliar a permeabilidade *in vitro* por meio de cultura de células da hidroclorotiazida, mistura física e complexo de inclusão obtido;
- Analisar a atividade microbiológica *in vitro* no norfloxacino e complexos de inclusão obtidos.





---

---

## **CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica**

---

---



## 1. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi proposto em 1995 por Amidon e colaboradores e baseia-se no reconhecimento da solubilidade do fármaco e sua permeabilidade gastrointestinal como parâmetros fundamentais que regulam a absorção do fármaco. Estes parâmetros constituem um alicerce científico para classificação dos fármacos em quatro classes, de acordo com sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, como representada na figura 1 (AMIDON et al., 1995; UEDA et al., 2002).

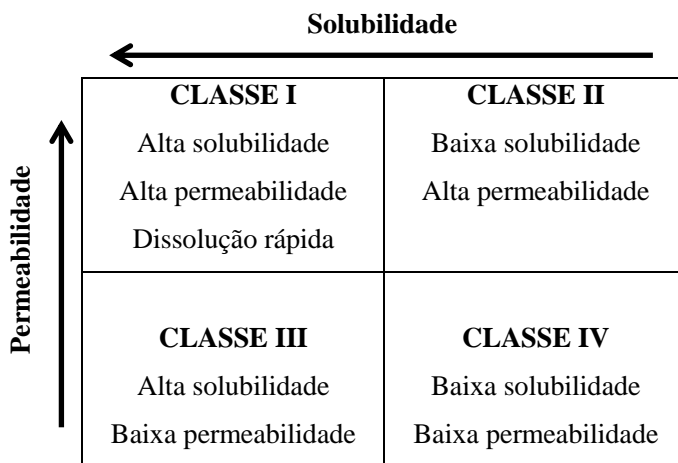


Figura 1. Sistema de classificação Biofarmacêutica como definido por Amidon e colaboradores (1995). Fonte: adaptado de Smetanová (2011).

A biodisponibilidade do fármaco é um pré-requisito para sua absorção e consequente resposta clínica da maioria dos fármacos administrados oralmente. Exceções, como fármacos que atuam no trato gastrointestinal (antiácidos, laxantes entre outros), não estão contempladas nesta classificação (AMIDON, GORDON L et al., 1995).

A classificação de solubilidade leva em consideração a maior dosagem de uma forma farmacêutica de liberação imediata. Um fármaco é classificado como altamente solúvel quando sua maior dosagem é solúvel em 250 mL de água ou menos, numa faixa de pH de 1,0 a 7,5. Do contrário, a substância é considerada pouco solúvel. O volume de 250 mL provém dos estudos de bioequivalência em que a forma farmacêutica é administrada com um copo de água a voluntários humanos em jejum (AMIDON, GORDON L et al., 1995; UEDA et al., 2002; KASIM et al., 2004).

A extensão da quantidade de fármaco permeado através da membrana intestinal humana classificará a substância de acordo com sua permeabilidade. Esta característica pode ser avaliada por diversos modelos animais ou *in vitro*, por exemplo, modelos de perfusão *in situ* em ratos ou cultura de células. Para um fármaco ser classificado como altamente permeável, a extensão da absorção intestinal deve ser igual ou maior que 90%. Diferentemente disto, o fármaco é considerado pouco permeável (AMIDON, GORDON L et al., 1995; SMETANOVÁ et al., 2011).

Um produto de liberação imediata é caracterizado com dissolução rápida quando não menos que 85% da quantidade de fármaco dissolve-se em 30 min com a utilização de aparato II a 50 rpm em um volume de 900 mL ou menos nos seguintes meios de dissolução: meio ácido (0,1 N HCl ou fluido gástrico simulado sem enzimas), tampão pH 4,5, tampão pH 6,8 ou fluido intestinal simulado sem enzimas. Qualquer outra condição encontrada, o produto é considerado com baixa dissolução (AVDEEF; BERGER; BROWNELL, 2000; UEDA et al., 2002). Nos últimos anos, o SCB tem sido aplicado também para formas farmacêuticas orais de liberação controlada, além das formas de liberação imediata (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; BREDA et al., 2009).

Apesar do avanço dos estudos de formas farmacêuticas com rotas alternativas de administração, a via oral continua representando a rota de escolha para administração dos fármacos devido a sua conveniência e baixo custo. Entretanto, para atingir concentrações terapêuticamente efetivas, o fármaco deve apresentar propriedades biofarmacêuticas satisfatórias. Após a administração de uma forma farmacêutica oral, esta deve desintegrar-se com posterior dissolução, conseqüente solubilização no meio aquoso e permeabilidade através da membrana gastrointestinal. No caso de fármacos do SCB IV, este processo de absorção é comprometido, pois suas características biofarmacêuticas representam um obstáculo significativo para absorção eficiente, o que pode acarretar em uma baixa biodisponibilidade e efeitos sub-terapêuticos (LIPINSKI, 2002; BUCKLEY et al., 2012).

O desenvolvimento de novas entidades químicas é estimado em cerca de 670 milhões de dólares. De igual importância é o fato deste processo de desenvolvimento requerer 12 anos em média para ser completado (GRASS, 1997). A cada 30 mil novos compostos sintetizados, oito compostos passam por todas as fases de desenvolvimento e regulamentação e apenas um único composto é capaz de atingir o mercado (SHILLINGFORD; VOSE, 2001). Neste processo, 40% das falhas devem-se a problemas de farmacocinética e 30% de falta de eficácia clínica, ou seja, os problemas de absorção estão contemplados nestas etapas e refletem

em uma grande parte deste fracasso. Neste contexto, a utilização de fármacos com propriedades bem estabelecidas, atividades e efeitos colaterais reconhecidos, como os pertencentes ao SCB IV, torna-se uma alternativa frente às dificuldades do descobrimento de novos fármacos e ao processo dispendioso. Alterações farmacotécnicas da formulação podem ser realizadas a fim de modular a liberação do fármaco de modo a melhorar as características biofarmacêuticas indesejáveis. Existem técnicas laboratoriais promissoras que acarretam em um custo muito menor em longo prazo e mais rapidamente alcançado do que a síntese de novos compostos (RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008; FLORENCE; ATTWOOD, 2011; WANG, XUE et al., 2012).

## **2. HIDROCLOROTIAZIDA**

A hidroclorotiazida (figura 2, HCTZ) descoberta em 1958 foi o primeiro fármaco realmente eficaz utilizado no tratamento de hipertensão arterial (RICHTERICH, 1958). Classifica-se com baixa solubilidade e baixa permeabilidade, ou seja, pertencente à classe IV do SCB. Quimicamente, 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, caracteriza-se como um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, de sabor amargo, muito pouco solúvel em água, solúvel em acetona e metanol e pouco solúvel em etanol. A faixa de fusão do fármaco é entre 266 °C e 270 °C, com decomposição (USP, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O fármaco é obtido pela combinação entre 5-cloro-2,4-disulfamilanilina e formaldeído em solução aquosa alcalina. Esta mesma reação é capaz de formar a clorotiazida, por isso é um produto conhecido como impureza da HCTZ, com atividade semelhante e propriedades biofarmacêuticas distintas. Ademais, a HCTZ apresenta instabilidade frente à luz e soluções aquosas básicas (MOLLICA et al., 1971; REVELLE et al., 1997; FANG et al., 2001).

Atualmente, existem 98 registros de medicamentos contendo HCTZ isolada ou em associações na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). É amplamente utilizada no tratamento de edema, insuficiência cardíaca congestiva, desordens renal e hepática. Pode ser administrada isolada ou em associação para hipertensão, como por exemplo, com os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e betabloqueadores (RANG; RITTER; DALE, 2012).

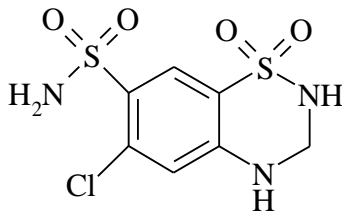


Figura 2. Estrutura química da hidroclorotiazida.

A hipertensão, ou pressão sanguínea alta, é um dos riscos primários para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e derrame cerebral. Estas são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como as principais causas de mortalidade globalmente conhecidas. A hipertensão é um importante desafio da saúde pública devido a sua alta frequência, concomitante risco de doenças cardiovascular e renal, além do fato de apresentar-se de forma silenciosa, em que o paciente pode conviver por anos com a elevada pressão arterial sem ser diagnosticada (KEARNEY et al., 2005; CHOCKALINGAM; CAMPBELL; FODOR, 2006).

A hipertensão primária, definida como elevada pressão sanguínea sem etiologia conhecida, é uma condição em ascensão e sua prevalência é entre crianças e adolescentes. Estudos recentes estimaram uma prevalência de 3,5% nesta população, aproximadamente duas vezes maior que a estimativa prévia de 1 a 2%. Um dos maiores problemas que afetam esta população é a falta de suspensões ou outras formulações apropriadas para as crianças. Atualmente no mercado não existe nenhuma forma farmacêutica líquida de HCTZ, espironolactona ou furosemida no mercado. Diante deste cenário, a recomendação é triturar comprimidos, abrir cápsulas para misturar na alimentação da criança, ou ainda farmacêuticos são solicitados para preparar suspensões a partir destas formas farmacêuticas. Entretanto, dados de estabilidade para suspensões “extemporâneas” apresentam problemas inerentes à formulação, como estabilidade limitada e uniformidade questionável, o que repercute na problemática do seu uso (FLYNN, 2002; KOROLKOVAS; FRANÇA; CUNHA, 2006; YOON et al., 2009).

A HCTZ pertence à classe dos diuréticos tiazídicos que inibem o transporte de  $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$  no túbulo coletor distal, e o túbulo proximal pode ser considerado com um local de ação secundário. Fisiologicamente, o transporte é controlado por uma bomba de íons sódio na membrana basolateral. A energia livre do gradiente eletroquímico dos íons sódio é aproveitada pelo simporte  $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$  na membrana luminal que move o  $\text{Cl}^-$  até o epitélio celular contra seu gradiente eletroquímico. Os íons cloreto, então,

saem da membrana basolateral passivamente via canal de  $\text{Cl}^-$ . Os diuréticos tiazídicos inibem o simporte  $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$  (figura 3) causando natriurese com perda destes íons. Porém, em pequena proporção, pois cerca de 90% da carga de  $\text{Na}^+$  filtrado é reabsorvido antes de atingir o túbulo contorcido distal. Os diuréticos tiazídicos foram sintetizados com o intuito de aumentar a potência dos inibidores da anidrase carbônica, entretanto, esta ação é muito pouco observada o que leva a uma maior excreção de  $\text{HCO}_3^-$  e fosfato. Ainda, a administração aguda destes diuréticos aumenta a excreção de ácido úrico, reduzindo-se com a administração crônica. A perda de íons potássio e magnésio podem ser importantes, porém reduz a eliminação de íons cálcio, o que favorece os tiazídicos em relação aos diuréticos de alça em termos de metabolismo ósseo em longo prazo. A classe da HCTZ é bem tolerada e em ensaios clínicos demonstrou reduzir os riscos de acidente vascular cerebral (AVC) e de infarto do miocárdio associado à hipertensão (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2010; SWEETMAN, 2011; RANG; RITTER; DALE, 2012).

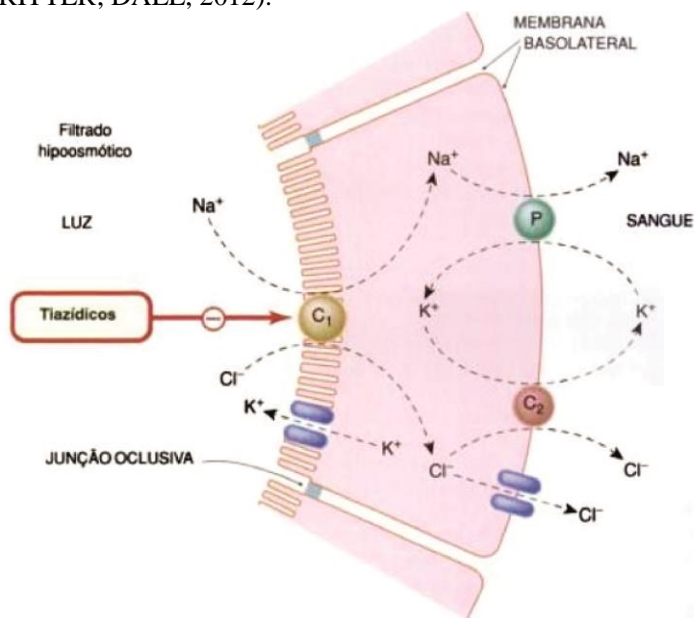


Figura 3. Transporte de íons no túbulo distal, mostrando o local de ação da HCTZ, diurético tiazídico.  $\text{C}_1$  representa o sistema de cotransporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ .  $\text{C}_2$  representa o cotransporte eletroneutro de  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . E  $\text{P}$  representa a bomba de sódio. Fonte: adaptado de Rang e colaboradores (2012).

As tiazidas precisam ter acesso ao lúmen tubular para exercer sua ação e fármacos como a probenecida competem pelo sítio de ação das tiazidas, ou seja, o transporte para o túbulo proximal, e podem atenuar a resposta diurética. Os tiazídicos podem ainda reduzir os efeitos dos anticoagulantes, sulfonilureias e insulina reduzindo, portanto a tolerância à glicose (SWEETMAN, 2011; RANG; RITTER; DALE, 2012).

A absorção da HCTZ no estômago é mínima sendo a maior parte do fármaco absorvido no duodeno e jejuno superior, com uma ampla variação na biodisponibilidade em torno de 60% e tempo de meia vida de 8 a 10h. O pico de concentração plasmático é atingido 2 h após administração oral e varia entre 120 a 500 ng/mL, dependendo da dosagem. Apresenta uma ligação preferencial às células sanguíneas vermelhas, e o equilíbrio entre estas células, o fármaco e o plasma é alcançado após 4 h da administração. A HCTZ atravessa a barreira placentária e é distribuída no leite materno. Seres humanos não são capazes de metabolizar a HCTZ e esta é eliminada praticamente inalterada em sua totalidade (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2010; SWEETMAN, 2011; RANG; RITTER; DALE, 2012).

### 3. NORFLOXACINO

Infecção do trato urinário (ITU) é um termo amplo que se refere às infecções predominantemente bacterianas nas vias urinárias, seja na bexiga, próstata, sistema coletor ou rins. As ITUs estão entre as mais antigas e frequentes infecções encontradas na comunidade e na prática hospitalar (MILLER; HEMPHILL, 2001). Nos primeiros três meses de vida, a ITU acomete mais o sexo masculino por apresentar anormalidades como a presença de válvulas na uretra posterior. Estas válvulas formam um obstáculo que se opõe a eliminação da urina e, conseqüentemente, causa a retenção urinária no segmento, fator de predisposição à infecção (GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012).

Desta idade em diante, as infecções são mais comuns no sexo feminino devido a uma típica condição funcional, o refluxo de urina devido à incompetência da válvula vesico-uretral, o que normalmente é corrigida espontaneamente ao se atingir a puberdade. Uma vez que a infecção não é corretamente controlada, a bactéria responsável pode atingir e desenvolver-se na pélvis e no interior dos rins, o que pode resultar em múltiplos episódios de pielonefrite e evoluir para falência renal crônica (MILLER; HEMPHILL, 2001; GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012). Outros fatores como a uretra feminina mais curta e sua maior proximidade do ânus possibilita a colonização desta por enterobactérias (principalmente



*Escherichia coli*) que são as maiores causadoras de ITU (KRIEGER, 2002; WAGENLEHNER; WEIDNER; NABER, 2006). Nos idosos, a instrumentação em homens, anormalidades anatômicas, e acima de tudo a condição de acamado contribuem para maior incidência de ITUs (NEU, 1992; FRANCO, 2005).

Estas infecções destacam-se não somente pela sua frequência, mas também pela possibilidade de complicações graves, como a insuficiência renal e a septicemia (WAGENLEHNER; WEIDNER; NABER, 2006).

A escolha de antimicrobianos para o tratamento de ITU deve ser baseada no tipo de infecção, no padrão de suscetibilidade das bactérias causadoras e em possíveis contraindicações individuais do paciente. Por ser constante a prática de iniciar o tratamento empiricamente na maioria dos pacientes, o conhecimento do padrão de resistência bacteriana local é fundamental (NORRBY, 1994).

O fenômeno da resistência antimicrobiana foi descoberto nos anos 1960 a 1980 e representa a evolução contínua na luta pela sobrevivência das espécies. Estas estão relacionadas com infecções hospitalares e também com ITUs com um potencial epidemiológico significativo. O uso prolongado de antibióticos condiciona o aumento do risco de colonização e infecção. As manifestações clínicas podem não ser mais graves, mas complicam a sua abordagem estreitando o leque de opções terapêuticas. A prescrição de doses adequadas, em intervalos corretos e otimização das condições responsáveis por permitir adequados níveis no local de infecção são igualmente variáveis determinantes na eficácia e no resultado final (PINA et al., 2010; GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012).

Neste sentido, a emergência de micro-organismos resistentes aos referidos antimicrobianos tornou-se um importante problema de saúde pública condicionando manifesto aumento de custos e, sobretudo, risco de morbimortalidade significativo (PINA et al., 2010; DALHOFF, 2012).

A ANVISA lançou recentemente a RDC nº 20, de 5 de maio de 2011, que se trata basicamente do controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos. Com esta resolução, a venda de antimicrobianos somente poderá ser efetuada mediante receita de controle especial, com a retenção da segunda via, evitando, portanto o uso indiscriminado de antibióticos e consequentemente o surgimento de micro-organismos resistentes (BRASIL, 2011).

A descoberta do ácido nalidíxico em 1962, e sua introdução para uso clínico em 1967, marcou o início de cinco décadas de desenvolvimento e utilização de quinolonas. Entretanto, as quinolonas formaram um grupo negligenciado até o desenvolvimento das fluorquinolonas nos anos de 1970 e 1980. As fluorquinolonas representam um avanço terapêutico

particularmente importante, visto que esses fármacos são dotados de ampla atividade antimicrobiana e mostram-se eficazes após administração oral no tratamento de uma grande variedade de doenças infecciosas. A relação estrutura-atividade farmacológica relata o átomo de flúor na posição 6 o que proporciona maior potência contra organismos gram-negativos e o núcleo piperazínico na posição 7 é responsável pela atividade antipseudomonas (ANDERSSON; MACGOWAN, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005; CHENG et al., 2013).

O norfloxacin (NFX, Figura 4), comercializado desde 1986, é uma fluorquinolona de largo espectro, efetivo contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos. O mecanismo de ação deste fármaco pode ser descrito em dois passos, em que o primeiro é a formação reversível de complexos fármaco-enzima-ADN (ação bacteriostática). Este mecanismo bloqueia a replicação do ADN bacteriano, induz a resposta bacteriana e permite a filamentação celular (Figura 5) (VAN BAMBEKE et al., 2005; BOLON, 2009; CHENG et al., 2013).

O segundo passo letal requer altas concentrações de fármaco, e os fragmentos de ADN são liberados da restrição por duas vias, uma que requer síntese de proteína (Figura 5d-e) e outra não (Figura 5f). Cada via de morte celular depende da estrutura da quinolona. Entretanto, o conhecimento sobre a ação destas está longe de estar completamente entendido e necessita ainda ser explorado. O NFX, por exemplo, representa uma situação intermediária (Figura 5e), porém como o fármaco intercala no ADN para impedir a replicação ainda não é bem compreendido (DRLICA et al., 2008; WANG, XIUHONG et al., 2010; CHENG et al., 2013).

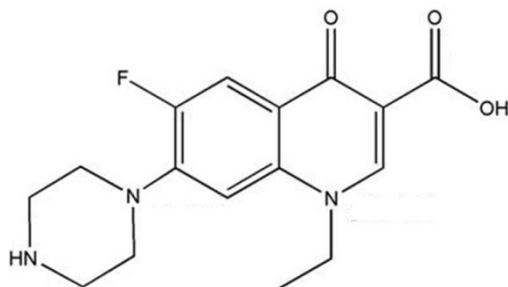


Figura 4. Estrutura química do norfloxacin.

O NFX é indicado terapeuticamente em humanos para o tratamento de uma variedade de infecções do trato urinário (cistite, pielite, cistopielite, pielonefrite, prostatite crônica, epididimite), bem como para o tratamento

uretrite, faringite, proctite ou cervicite gonocócicas, febre tifóide e na profilaxia de infecções bacterianas em pacientes neutropênicos acometidos pelo câncer. O fármaco também é efetivo em infecções gastrointestinais, devido a sua atividade pronunciada contra patógenos responsáveis por doenças diarreicas (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* e *E. Coli*). Recomenda-se uma posologia de 400 mg a cada 12 horas em que a duração do tratamento varia de acordo com o diagnóstico (EMMERSON; JONES, 2003).

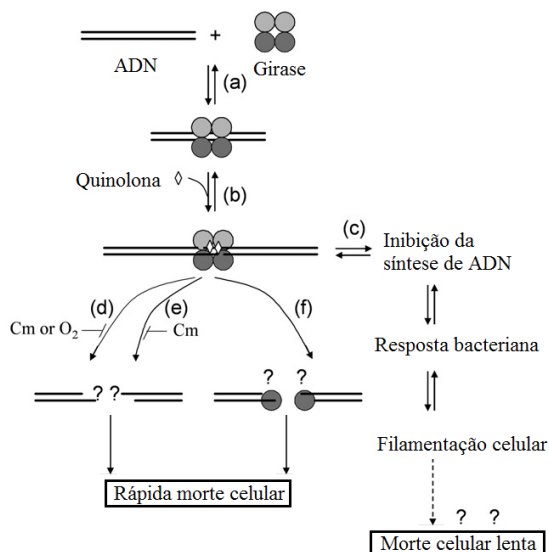


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação das quinolonas. (a) Ligação da girase com o ADN. Formação reversível de complexos fármaco-enzima-ADN que rapidamente bloqueiam a replicação do ADN. (c) Inibição da replicação leva a indução da resposta bacteriana e filimentação celular. (d) Fragmentação letal do cromossomo que requer síntese proteica em condições aeróbias. (e) Fragmentação letal do cromossomo que requer síntese proteica, mas não em condições aeróbias. (f) Fragmentação letal do cromossomo que não requer nem síntese proteica nem em condições aeróbias. Pontos de interrogação indicam incertezas. Fonte: adaptado de Cheng e colaboradores (2013).

Após administração oral da dose de 400 mg, aproximadamente 30-40% é absorvida. A absorção do NFX ocorre com maior extensão no duodeno e menor no jejuno. Os alimentos podem retardar a absorção, porém a quantidade absorvida não é afetada. A absorção é rapidamente seguida por uma concentração plasmática máxima atingida ( $C_{max}$ ) de

aproximadamente 1,5 µg/mL em humanos. O tempo para atingir este pico plasmático é de aproximadamente 1 a 2 horas ( $t_{max}$ ). A ligação às proteínas plasmáticas é de 10 a 15%. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) é de 3 a 4 horas e sua metabolização origina seis diferentes metabólitos com uma atividade antimicrobiana mínima quando comparada ao composto original. NFX é metabolizado e eliminado por excreção biliar e renal. A área sob a curva da concentração plasmática versus tempo (ASC) é de 6,4 µg.h/mL (TAKÁCS-NOVÁK et al., 1992; AL-RASHOOD et al., 2000; VAN BAMBEKE et al., 2005; BOLON, 2009). Quimicamente, o NFX é denominado como ácido 1-etil-6-fluor-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolino carboxílico e pertence ao grupo IV do SCB (pouco solúvel e pouco permeável). É um pó cristalino branco a amarelo claro, pouco solúvel em água, metanol, etanol, acetato de etila e acetona, facilmente solúvel em ácido acético, ligeiramente solúvel em clorofórmio e insolúvel em éter etílico. Tem faixa de fusão entre 227-228 °C, massa molecular de 319,34 g/mol e fórmula molecular  $C_{16}H_{18}FN_3O_3$  (BREDA et al., 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O NFX é um fármaco que pode ser considerado higroscópico e fotossensível. Este sofre degradação quando em exposição à luz direta ou fluorescente, originando derivados da fotodecomposição. Ainda em exposição prolongada ao calor e solução ácida o fármaco sofre hidrólise e resulta em um análogo descarboxilado. Esta forma descarboxilada é de fundamental importância comparada com os outros produtos de degradação, uma vez que o grupo carboxílico é responsável pela atividade farmacológica do NFX. Além disso, o análogo descarboxilado tem sido identificado como precipitado em formulações injetáveis e como impureza em matérias-primas (EL KHATEEB; ABDEL RAZEK; AMER, 1998; ALNAJJAR; IDRIS; ABUSEADA, 2007).

## 4. CICLODEXTRINAS

### 4.1 DEFINIÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs), também conhecidas como cicloamiloses ou cicloglicoamilose, são oligossacarídeos cíclicos troncocônicos contendo de seis a doze unidades de glicose. Estas moléculas foram descobertas em 1891 por Villiers, entretanto a primeira descrição detalhada da preparação e isolamento foi relatada por Schardinger em 1903. As CDs compreendem uma família macrocíclica obtida do amido por uma degradação enzimática. As unidades de glicose individuais são mantidas em uma conformação de cadeira e mantêm-se unidas por meio

de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas para formar uma estrutura cíclica troncocônica (Figura 6). Uma das consequências mais importantes da conformação destas unidades de glicopirranose é a respeito da distribuição dos grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Uma vez que todas as glicoses estão alinhadas na forma *cis*, a CD apresenta suas hidroxilas secundárias O2 e O3 e sua hidroxila primária O6 na parte externa ao cone, o que confere a característica de solubilidade em água. Entretanto, a cavidade da CD apresenta um caráter hidrofóbico uma vez que é recoberta pelos hidrogênios C3-H, C5-H e C6-H<sub>2</sub> e pelo oxigênio O4 com comportamento de éter. Consequentemente, a cavidade fornece uma matriz hidrofóbica em solução aquosa, o que resulta no termo “ambiente microheterogêneo”. Esta cavidade hidrofóbica pode ser ocupada por uma grande variedade de moléculas hóspedes, formando então os complexos de inclusão por meio de ligações de hidrogênio e preferencialmente com moléculas aniônicas. Os complexos de inclusão formados são entidades que compreendem duas ou mais moléculas, em que uma das moléculas, a hospedeira, inclui totalmente ou em parte, somente por forças físicas, uma molécula hóspede (VILLERS, 1891; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008; GHOSH; NAU, 2012).

De importância prática, as CDs produzidas industrialmente são a  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ CD (Figura 7), que são compostas por seis, sete e oito unidades de D-glicopirranose com ligações  $\alpha$ -1,4, respectivamente. Suas principais propriedades estão sumarizadas na tabela 1. Apresentam-se com ampla gama de aplicação, incluindo produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos e químicos. Adicionalmente, as CDs são reconhecidas por aumentar a solubilidade da molécula incorporada, agir como potencializadores da permeação de macromoléculas e mascarar sabores (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; FIGUEIRAS et al., 2009; TAFAZZOLI; GHIASI, 2009; MADY et al., 2010; PATHAK et al., 2010).

As CDs possuem massa molar com distribuição entre 1000 a 2000 Da e possuem muitos grupamentos doadores e aceptores de H, em consequência, não são significativamente absorvidas no trato gastrointestinal. As naturais  $\alpha$  e  $\beta$ CD não podem ser hidrolisadas pelas amilases salivares e pancreáticas humanas, ao contrário da  $\gamma$ CD. A  $\alpha$ CD é bem tolerada e não está associada com efeitos adversos significantes. Pequenas porções desta CD podem ser absorvidas e é excretada de forma inalterada na urina após administração intravascular. Pode ser encontrada comercialmente como solução parenteral ou na forma de comprimidos (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

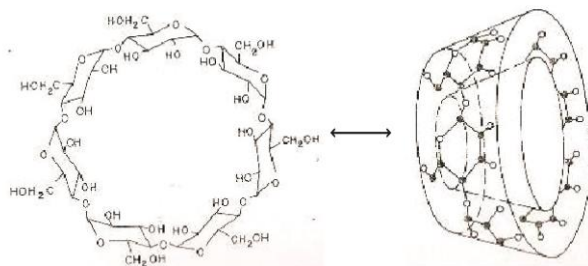


Figura 6. Representação da estrutura química da βCD e sua forma troncocônica da molécula. Fonte: adaptado de Singh (2010).

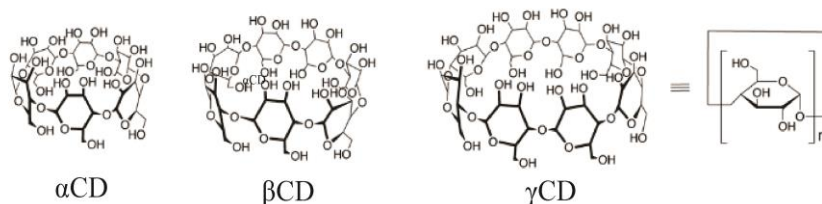


Figura 7. Estrutura representativa das Ciclodextrinas. Fonte: adaptado de Gosh e Nau (2012).

Tabela 1. Principais propriedades das CDs de origem natural.

Propriedade	αCD	βCD	γCD
Unidades de glicopirranose	6	7	8
Massa molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (% , m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 7,8	7,5 – 9,5
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Preço aproximado (\$/kg) <sup>a</sup>	45	5	80

Fonte: adaptado de Valle (2004) e Brewster (2007).

<sup>a</sup> Preço aproximado de 1 kg em dólar americano (\$). O preço depende da pureza e grau tecnológico da CD.

A βCD é a mais produzida, mais utilizada e de menor custo. Possui uma cavidade com diâmetro interno de 6,0 a 7,8 Å e uma profundidade de

7,9 Å. Esta cavidade interna tem uma capacidade excelente em incorporar moléculas hidrofóbicas hóspedes em solução aquosa. Apresenta irritação menor que a  $\alpha$ CD após injeção intramuscular, pequena quantidade é absorvida no trato intestinal superior após administração oral (1 – 2%) e não apresenta metabolismo no trato gastrointestinal. Pode ocorrer degradação e fermentação por bactérias no cólon gerando produção de gás e eventualmente, diarreia. Não pode ser administrada parenteralmente devido a sua nefrotoxicidade e baixa solubilidade, porém é essencialmente não tóxica quando administrada oralmente. Este efeito não tóxico da  $\beta$ CD foi determinado em 0,7-0,8 g/kg/dia em ratos e em cerca de 2g/kg/dia em cães. Pode ser encontrada ainda em diversas formas farmacêuticas comerciais tópicas, bucais e retais (BELLRINGER et al., 1995; DEL VALLE, 2004; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; RIBEIRO et al., 2007).

A  $\gamma$ CD possui uma cavidade maior que as outras CDs naturais, o que torna desfavorável a inclusão de substâncias muito pequenas. O metabolismo da  $\gamma$ CD assemelha-se como do amido e dextrinas lineares, em que pequenas quantidades são absorvidas da forma inalterada no trato gastrointestinal e a maior parte é excretada inalterada na urina após administração intravascular. Existem no mercado formulações contendo  $\gamma$ CD em sua forma modificada para HP $\gamma$ CD, como solução ocular e solução intravenosa. Um trabalho interessante da  $\gamma$ CD recente foi o desenvolvimento de um complexo de inclusão com a ampicilina, que devido à sua inclusão na cavidade demonstrou uma redução da velocidade de hidrólise do antibiótico na presença da  $\beta$ -lactamase, enzima bacteriana de resistência (DEL VALLE, 2004; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; VENTURINI et al., 2008).

As CDs possuem muitos grupamentos hidroxilas externamente, o que confere a capacidade de serem modificadas seletivamente com vários reagentes para formar derivados funcionalizados. Estes podem ser formados por aminação, esterificação ou eterificação dos grupamentos hidroxilas primários e secundários. Os derivados semissintéticos possuem elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a hidroxil-propil- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD), a hidroxil-propil- $\gamma$ -CD (HP $\gamma$ CD), a sulfo-butil-éter- $\beta$ -CD (SB $\beta$ CD) e a metil- $\beta$ -CD randomizada (RM $\beta$ CD), ampliando as possibilidades de utilização. Todos os derivados terão modificações no volume da cavidade hidrofóbica o que pode modificar ainda a estabilidade contra luz ou oxigênio ajudando a controlar a reatividade química das moléculas hóspedes. Existe ainda uma  $\beta$ CD insolúvel em água ( $\beta$ CPD) capaz de remover poluentes orgânicos e metais pesados da água. Outras CDs são materiais hidrofílicos insolúveis em

água utilizadas como matriz de suporte para separação cromatográfica (CRINI, 2005; RIBEIRO et al., 2007; RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008; ZHAO et al., 2009; GAMSIZ et al., 2010).

A HP $\beta$ CD é bastante solúvel e mais toxicologicamente benigna que o seu derivado natural  $\beta$ CD. Em geral é bem tolerada em humanos e os principais efeitos adversos são fezes moles e diarreia. Existe comercialmente em formulações intravenosas e orais. Após administração intravenosa, a HP $\beta$ CD é exclusivamente eliminada via renal e pacientes com insuficiência renal severa devem evitar esta CD (GOULD; SCOTT, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008).

As CDs são objeto de estudo de quase 1000 artigos de pesquisa e resumos científicos a cada ano, e grande parte destes lidam com fármacos ou produtos farmacêuticos relacionados. Além do mais, muitas invenções descritas têm utilizado as CDs e são responsáveis por mais de 1000 patentes e suas aplicações nos últimos 5 anos. Do ponto de vista regulatório, já está atualmente disponível como monografia na Farmacopeia Americana e Europeia para a  $\beta$ CD, sendo finalmente depois de um século da sua descoberta, reconhecidos como verdadeiro excipiente farmacêutico. Similarmente, a  $\alpha$ CD está listada na Farmacopeia Europeia, Americana e Japonesa e a  $\gamma$ CD apenas na Japonesa, mas será incluída na Europeia e na Americana. Uma monografia para a HP $\beta$ CD está disponível na Farmacopeia Europeia e um anteprojeto está circulando na Farmacopeia Americana. A  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD foram também inseridas na lista de produtos seguros da Food and Drug Administration (FDA) para utilização como aditivos em alimentos em 2004, 2001 e 2000, respectivamente (DEL VALLE, 2004; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

O primeiro produto farmacêutico do mundo contendo CD foi comercializado no Japão em 1976. Trata-se de um comprimido sublingual de prostaglandina E2/ $\beta$ CD registrado como Prostarmon E<sup>TM</sup>. O primeiro produto farmacêutico europeu surgiu 12 anos depois, o piroxicam/ $\beta$ CD (Brexin® comprimidos), e nos Estados Unidos da América foi uma solução oral de itraconazol com 2-HP $\beta$ CD em 1997 (Sporanox®). Mundialmente, 35 diferentes formas farmacêuticas são comercializadas como sólidos ou soluções baseadas em formulações com complexos de CDs. Nestas formulações, as CDs são utilizadas como agentes complexantes para aumentar a solubilidade dos fármacos, biodisponibilidade e estabilidade (CHALLA et al., 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).



## 4.2 COMPLEXOS DE INCLUSÃO: FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Os complexos de inclusão podem ser formados quando o fármaco e a CD estão em solução aquosa em que as moléculas de água inseridas na cavidade da CD perdem lugar para a molécula hóspede por ser energeticamente mais favorável, uma vez que as moléculas hóspedes são menos polares que a água. Nenhuma ligação covalente é formada ou alterada durante a formação do complexo de inclusão. A estabilidade destes é provida por ligações não covalentes, como interações hidrofóbicas, efeitos eletrônicos, fatores estéreos e forças de Vander Walls (LOFTSSON et al., 2007; RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008).

Existem diversas metodologias de obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido, e a produção do complexo com melhores características está fortemente relacionada ao fármaco a ser complexado, não existindo métodos melhores pré-definidos. A escolha destes muitas vezes leva em conta os equipamentos disponíveis, a simplicidade do método, as características do fármaco e a facilidade de transposição para escala industrial. As principais técnicas de obtenção em fase líquida, sólida ou semissólida serão explanadas a seguir (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

As técnicas de obtenção em fase líquida são a coprecipitação, a coevaporação, neutralização e liofilização. A coprecipitação consiste em um dos métodos mais adequados para a preparação dos complexos de inclusão com CDs, baseada no isolamento do complexo por meio de soluções saturadas em meio aquoso. Esta metodologia necessita, entretanto, que os complexos apresentem solubilidade limitada, ou seja, diagramas de fase do tipo B<sub>s</sub>. Já a técnica de coevaporação consiste na preparação de uma solução hidroalcolica da CD e molécula hóspede em quantidades estequiométricas, agitada durante o tempo de equilíbrio determinado na solubilidade de fases e evaporada sob vácuo em rotaevaporador. Da mesma forma ocorre a liofilização, porém a solução estequiométrica é preparada em água e posteriormente liofilizada. Este método é facilmente transposto para escala industrial. A neutralização é um processo para fármacos com um grupamento funcional ácido ou básico. A substância hóspede é dissolvida como sal numa solução ácida ou básica de CD, a qual é posteriormente neutralizada, precipitando o complexo de inclusão sólido. Este processo está limitado a fármacos que não sejam instáveis em meios alcalinos ou ácidos. Deve-se ressaltar que a CD hidrolisa em soluções fortemente ácidas originando oligossacarídeos

lineares (CHALLA et al., 2005; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; LOFTSSON et al., 2007).

A metodologia em fase semissólida consiste na malaxagem, técnica aplicada a fármacos muito pouco solúveis em água. Baseia-se na adição da substância hóspede a uma pasta aquosa de CD e posteriormente prossegue-se com a secagem. É um processo amplamente utilizado, pode ser transposto para grande escala além de ser simples e rápido. Para a obtenção de complexos de inclusão em fase sólida podem ser utilizados a moagem ou o fluido supercrítico. A moagem não necessita da utilização de água ou outro tipo de solvente, porém não é aplicável a todas as substâncias. Apresenta ainda o inconveniente de o produto final ser instável e poder originar uma mistura física na presença de elevados teores de umidade. A utilização do fluido supercrítico tem surgido na atualidade como um método alternativo aos métodos convencionais e não utiliza solventes aquosos e orgânicos. Apresenta como desvantagem a necessidade de conhecimento da solubilização do fármaco e da CD em dióxido de carbono e a disponibilidade de equipamento (DE MARCO; REVERCHON, 2008; RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008; GARNERO; AIASSA; LONGHI, 2012).

As propriedades físico-químicas das moléculas de fármaco são diferentes das moléculas de fármaco inclusas na cavidade da CD após a formação do complexo de inclusão. A estequiometria de formação do complexo e a constante de estabilidade podem ser determinadas pelas mudanças nas propriedades físico-químicas como solubilidade, máxima absorvância ultravioleta ou visível (UV/VIS), mudanças na fluorescência, reatividade química, mudança nos deslocamentos químicos no estudo de ressonância magnética nuclear (RMN), mudança nas medidas potenciométricas, mudança na estabilidade química, entre outros (CHALLA et al., 2005; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Para avaliação da formação dos complexos de inclusão, é necessário um conjunto de técnicas variadas para a comprovação da inclusão do fármaco na cavidade hidrofóbica da CD. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para tal são o estudo de solubilidade de fases inicialmente, técnicas físico-químicas de caracterização como análise térmica, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho, espectrofotometria UV/VIS, RMN, além de técnicas morfológicas como microscopia eletrônica de varredura bem como estudos de dissolução e permeabilidade (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON et al., 2007).

Higuchi e Connors, em 1965, propuseram uma classificação dos complexos baseado no efeito de solubilização da molécula hóspede

(substrato) frente a condições crescentes de CD (ligante), denominando os perfis de solubilidade de fase. Estes podem ser classificados segundo o tipo de curva que formam (Figura 8). O perfil de solubilidade de fase tipo A é obtido quando a solubilidade do fármaco hóspede é diretamente proporcional ao aumento da concentração de ligante (CD). Se a formação do complexo é de primeira ordem em relação ao substrato e ao ligante, então um perfil de solubilidade do tipo  $A_L$  é obtido. Quando a formação do complexo se dá por primeira ordem em relação ao substrato, mas segunda ordem em relação ao ligante, um perfil do tipo  $A_P$  pode ser observado. Diagramas do tipo  $A_N$  podem ser explicados por mudanças na solubilização do substrato em concentrações maiores ou ainda por agregação dos complexos de inclusão formados. O perfil de solubilidade de fase tipo B verifica-se à medida que o substrato tem sua solubilidade aumentada com concentrações maiores do ligante até certo nível, ou seja, o complexo de inclusão formado tem solubilidade limitada no meio aquoso de complexação. Inicialmente, existe um aumento da concentração da molécula hóspede e quando o limite de solubilidade é atingido, uma precipitação do complexo ocorre, diminuindo sua concentração. O diagrama do subtipo  $B_S$  representa um tipo B em que se atinge um valor limite de solubilidade da molécula hóspede e a adição de mais CD resulta na formação de mais complexo com consequente precipitação do complexo insolúvel. O perfil de solubilidade do tipo  $B_I$  pode ser interpretado de maneira similar ao  $B_S$ , com a diferença do complexo formado ser de tal maneira insolúvel que o aumento inicial da concentração de fármaco não é possível de se detectar (HIGUCHI; CONNORS, 1965; TAKAHASHI, ANDREA IKEDA; VEIGA, FRANCISCO JOSÉ BAPTISTA; FERRAZ, HUMBERTO GOMES, 2012).

O tipo de perfil de solubilidade de fase mais obtido é o tipo A que fornece uma estequiometria 1:1 entre o fármaco e a CD (Figura 9). Sob estas condições é possível determinar a constante de estabilidade ( $K_C$ ) por meio do coeficiente angular e da solubilidade intrínseca do fármaco. Outro parâmetro importante ainda que possa ser retirado deste diagrama é a eficiência de complexação (LOFTSSON et al., 2007; TAKAHASHI, ANDREA IKEDA; VEIGA, FRANCISCO JOSÉ BAPTISTA; FERRAZ, HUMBERTO GOMES, 2012).

A maioria dos complexos formados entre CD e fármacos é considerada complexos de inclusão. Entretanto, as CDs tem a capacidade de formar agregados em torno da molécula hóspede por meio de estruturas como as micelas. O estudo de solubilidade de fases fornece informações acerca da melhora da solubilidade do fármaco na presença do

ligante, não verifica a formação de verdadeiros complexos de inclusão, serve apenas como um indicativo da formação. Técnicas mais específicas que verifiquem os grupamentos orgânicos e a forma com que estão ligados são recomendadas (CHALLA et al., 2005; SINGH et al., 2010).

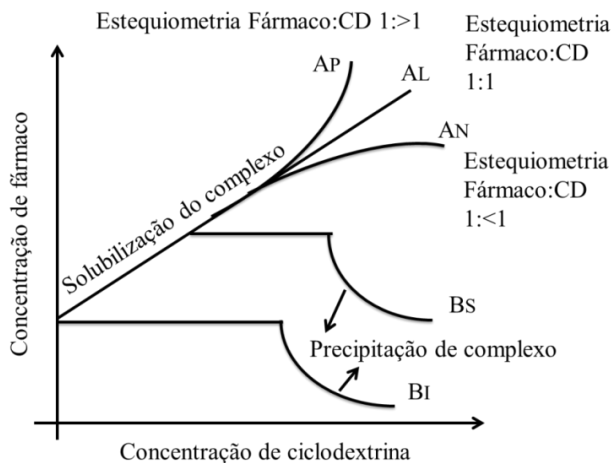


Figura 8. Tipos de diagramas de solubilidade de fase obtidos da formação de complexos de inclusão entre fármacos e CD. Fonte: adaptado de Takahashi (2012).

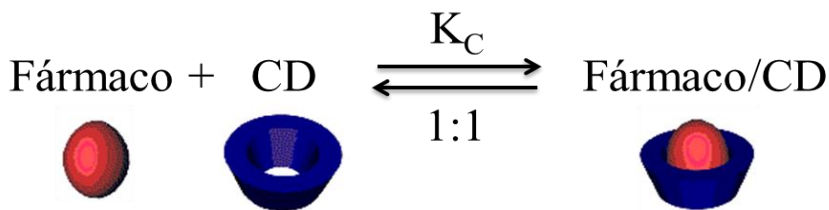


Figura 9. Equação representativa da formação do complexo de inclusão entre fármaco e CD na proporção molar 1:1.

A análise das propriedades físico-químicas do fármaco no estado puro, sua mistura física com o ligante e do complexo de inclusão formado é um fator importante na elucidação das propriedades bem como nos processos de desenvolvimento e controle de qualidade em escala laboratorial ou na transposição para a indústria farmacêutica. Esta caracterização revela a identidade do complexo formado, dados de morfologia, tamanho das partículas, solubilidade,  $pK_a$ , estabilidade, entre

outras. Para tanto, são essenciais os métodos analíticos clássicos como os instrumentais (SKOOG et al., 2002).

Por meio dos estudos de análise térmica, em que se utilizam métodos como a termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia com aquecimento, é possível determinar compatibilidade entre matérias-primas, estabilidade térmica e, conseqüentemente, auxiliar na seleção dos ligantes adequados como um estudo de pré-formulação. A DSC é ainda uma análise fundamental, pois identifica a formação de um complexo de inclusão verdadeiro, uma vez que o fármaco inserido na cavidade da CD tem o seu ponto de fusão deslocado para uma temperatura diferente, um alargamento ou ainda a aparição de novos eventos endotérmicos (LI et al., 2005; OLIVEIRA; BERNARDI; MURAKAMI; et al., 2009).

A difração de Raios-X de pó de uma substância permite identificá-la, bem como possibilita uma análise quantitativa de fases cristalinas presentes em misturas, sua estrutura espacial e grau de cristalinidade resultante do método de preparação da amostra. A análise do difratograma pode ser útil para determinar o modo de interação entre o fármaco e a CD. Outra técnica que se complementa com a difração é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), pois fornece informações visuais acerca das formas, tamanho e homogeneidade das partículas, ou seja, os hábitos das estruturas cristalinas que irão influenciar nas características de solubilidade, molhabilidade e conseqüente dissolução do complexo (SHAH, B.; KAKUMANU; BANSAL, 2006; AALTONEN et al., 2009).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é utilizada para estimar o grau de interação entre o fármaco e a CD no estado sólido. Por se tratar de uma pequena quantidade de pó representar o fármaco no complexo de inclusão sólido, algumas vezes as bandas do fármaco podem estar mascaradas no espectro da CD. Isto posto, a técnica é mais bem aplicada para fármacos que apresentem algumas bandas características, como grupamentos carbonílicos ou sulfonílicos (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; SINGH et al., 2010).

A ressonância magnética nuclear (RMN) 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. É uma técnica muito utilizada e constitui-se na evidência mais direta da inclusão de um fármaco na cavidade da CD (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; SKOOG et al., 2002; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

As metodologias cromatográficas são muito utilizadas no âmbito da quantificação dos fármacos nas mais diversas formulações, estudos de estabilidade, dissolução e em matriz biológica. Estas envolvem etapas de avaliação e otimização de condições, com posterior validação, necessária para demonstrar, experimentalmente, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, e assegura a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Todavia, a utilização de desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência ainda não é muito aplicada no âmbito da quantificação do fármaco incluso na cavidade da CD. Este fato pode ocorrer devido à necessidade de um processo pré-analítico de extração deste fármaco do complexo para sua posterior quantificação. Esforços já têm sido aplicados neste contexto de complexos de inclusão, gerando desta forma métodos analíticos confiáveis de alta resolução e ótima detecção dos compostos. A validação de um método analítico permite a aplicação para todos os estudos posteriores ao desenvolvimento como dissolução, estabilidade e permeabilidade, entre outros (BRASIL, . 2003; HUSSEIN; TURK; WAHL, 2007).

O ensaio de dissolução *in vitro* dos complexos de inclusão obtidos revela informações importantes acerca da tentativa de aperfeiçoamento da solubilidade e molhabilidade do fármaco por meio da formação de um complexo de inclusão, uma vez que consiste em uma etapa limitante para a absorção dos fármacos. Desta forma, sua avaliação, no decorrer do processo de desenvolvimento, permite a seleção dos melhores produtos sólidos obtidos que provavelmente apresentarão um perfil de liberação mais conveniente e reprodutível numa forma farmacêutica (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; MURAKAMI et al., 2008).

Outro problema fundamental que as CDs visam melhorar é a permeabilidade. Para tanto, testes de permeabilidade *in vitro* fornecem uma predição do que ocorrerá *in vivo*. Células Caco-2 foram inseridas por Artursson em 1997 e servem como modelo para permeabilidade intestinal de fármacos, muito utilizada atualmente devido à sua ótima correlação *in vitro* – *in vivo*. Este modelo é utilizado para a predição da absorção oral do fármaco que será transportado até a célula na forma de complexo de inclusão com as CDs (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012; BUCKLEY et al., 2012).

As metodologias e ferramentas analíticas descritas neste capítulo podem fornecer informações importantes acerca dos complexos de inclusão formados. Uma completa caracterização físico-química e morfológica dos complexos tanto em solução como no estado sólido são fundamentais para a confirmação da sua formação, o estabelecimento da

melhor metodologia de obtenção, bem como a predição do comportamento *in vivo* destas moléculas (SINGH et al., 2010; TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G., 2012).

#### 4.3 PROPRIEDADES DAS CICLODEXTRINAS E APLICAÇÃO NO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

As CDs não permeiam a membrana biológica somente devido à sua estrutura química, mas também por sua característica de elevado peso molecular e coeficiente de partição octanol/água muito baixo. Apenas o fármaco em sua forma livre, o qual está em equilíbrio com a CD na sua cavidade, é capaz de penetrar as membranas celulares (Figura 10). A CD confere ao fármaco um aumento em sua permeabilidade sem romper a camada lipídica da membrana celular. Neste caso, é importante a utilização de CD suficiente para solubilizar o fármaco no veículo aquoso uma vez que seu excesso pode diminuir a biodisponibilidade. Relata-se ainda que as CDs, por apresentarem a habilidade de raptar o colesterol, podem aumentar a fluidez da membrana e induzir a invaginação por meio da perda de resistência celular (CHALLA et al., 2005; CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; LOFTSSON et al., 2007).

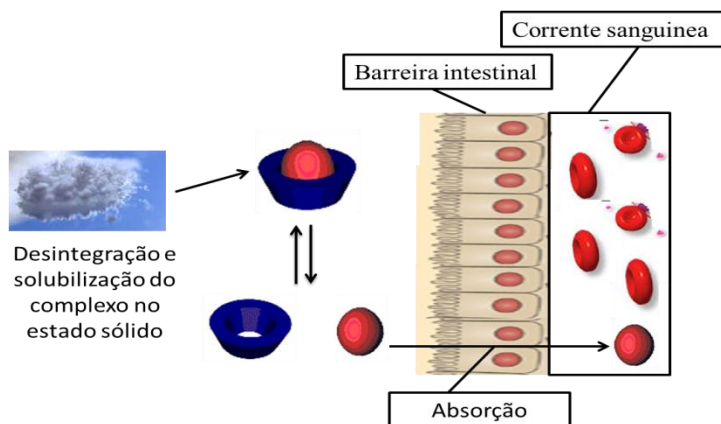


Figura 10. Esquema do processo de absorção intestinal do fármaco complexado na CD. Fonte: adaptado de Carrier, Miller e Ahmed (2007).

Outra importante vantagem que deve ser destacada é a capacidade de melhorar a estabilidade de muitos fármacos lábeis, uma vez que a formação de um complexo de inclusão protege contra processos de

desidratação, hidrólise, oxidação e fotodecomposição, prolongando o prazo de validade do fármaco (KANG et al., 2002; LOFTSSON et al., 2007).

Ademais, as CDs podem ser utilizadas para prevenir ou reduzir irritações oculares ou gastrointestinais, reduzir ou eliminar sabores e cheiros desagradáveis bem como converter fármacos oleosos ou líquidos em pós microcristalinos ou amorfos (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Uma abordagem interessante em que as CDs possam ser aplicadas é no contexto do SCB. Os fármacos classe IV, principalmente, são os que apresentam maiores problemas de biodisponibilidade. Neste cenário, a utilização das CDs podem alterar as propriedades destes fármacos e transforma-los em compostos com comportamento Classe I.

O desenvolvimento de um sistema carreador efetivo capaz de melhorar as características físico-químicas do fármaco com consequente aumento da biodisponibilidade tem ganhado atenção e consiste em um desafio crucial para a indústria e academia. Princípios ativos reconhecidos podem explorar os efeitos benéficos destes carreadores, de forma a obter melhoria nas propriedades biofarmacêuticas e ainda em sua efetividade terapêutica. Desta forma, problemas terapêuticos importantes como a resistência dos micro-organismos a estes fármacos, seus efeitos adversos e a não aderência do paciente ao tratamento poderiam ser minimizados (RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008).



---

---

## **CAPÍTULO 2 – Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica de suspensões pediátricas de fármacos anti-hipertensivos produzidas no Hospital Universitário (HU/UFSC)**

---

---

*Pharmaceutical Development and Technology*, 2013; 18(4): 813–820  
© 2013 Informa Healthcare USA, Inc.  
ISSN 1083-7450 print/ISSN 1097-9867 online  
DOI: 10.3109/10837450.2012.693504

**informa**  
healthcare

### **RESEARCH ARTICLE**

## **Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use**

Cassiana Mendes, Ana Paula Costa, Paulo Renato Oliveira, Monika Piazzon Tagliari, and Marcos Antônio Segatto Silva





## 1. INTRODUÇÃO

Suspensões farmacêuticas são comumente utilizadas como forma de administração de fármacos, particularmente para crianças que não conseguem ingerir formas farmacêuticas orais sólidas como cápsulas e comprimidos. Quando prescritas em âmbito hospitalar e não se encontram disponíveis comercialmente, geralmente comprimidos são triturados ou cápsulas são abertas, comprometendo a administração correta da dose e eficiência do tratamento (CONROY, 2003; KAYUMBA et al., 2007). Em geral, as medicações disponíveis comercialmente apresentam-se na forma farmacêutica de dosagem única e são significativamente grandes para população pediátrica, portanto, não podem ser facilmente fracionadas para doses menores, nem de forma reprodutível (por exemplo, comprimidos revestidos) (FREED et al., 2005). Usualmente, formas extemporâneas líquidas orais são facilmente preparadas e permitem a flexibilidade da dose. Entretanto, um problema principal constitui-se da falta de informação quanto à adequação da dose e estabilidade (PANDOLFINI; BONATI, 2005).

A maioria dos anti-hipertensivos está disponível apenas como forma farmacêutica sólida oral para uso adulto, criando assim, a necessidade de formulações para uso pediátrico (PANDOLFINI; BONATI, 2005). Furosemida (FRS, Figura 1A) (Ácido 5-(aminossulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino]-benzoico), é um diurético de alça pertencente à família das benzofuranosulfonamidas, utilizada no tratamento de edema associado à hipertensão, falência congestiva cardíaca, doenças pulmonares e renais (STRICKLEY et al., 2008; RANG; RITTER; DALE, 2012). Espironolactona (SPR, Figura 1B) ( $\gamma$ -Lactona do ácido (7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ )-7-(acetiltio)-17-hidroxi-3-oxopregn-4-eno-21-carboxílico), diurético poupador de potássio, antagonista competitivo da aldosterona, é o fármaco de escolha para o tratamento da hipertensão, hiperaldosteronismo e complicações cardiovasculares (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; KHAN et al., 2009; RANG; RITTER; DALE, 2012). Hidroclorotiazida (HCTZ, Figura 1C) (1,1-Dióxido de 6-cloro-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida), pertencente à classe dos benzotiazídicos, é um fármaco utilizado no tratamento da hipertensão leve a moderada, em conjunto com outros hipertensivos (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; RANG; RITTER; DALE, 2012).

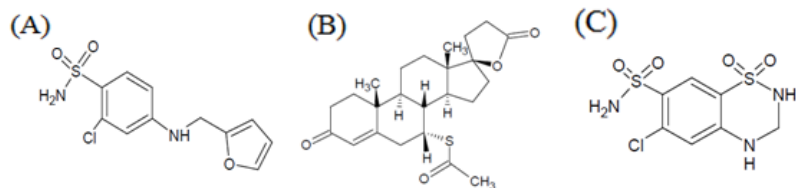


Figura 1. Estrutura química da furosemda (A), espironolactona (B) e hidroclorotiazida (C).

Algumas fundações tem demonstrado preocupação e, conseqüentemente, financiado a pesquisa do desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas estáveis para pacientes pediátricos. Entretanto, a necessidade destes estudos permanecerá devido à improbabilidade de que todos os fármacos aprovados para adultos sejam considerados para utilização em crianças e neonatos. Publicações de estudos com formulações que mantenham a estabilidade do fármaco oferecerão oportunidades para pacientes pediátricos de receber fármacos nas doses requeridas de uma forma mais efetiva e segura. No Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina, suspensões pediátricas extemporâneas de anti-hipertensivos (contendo FRS, SPR e HCTZ) são preparadas de acordo com a necessidade do paciente com um prazo de validade estimado de 7 dias.

Os excipientes utilizados são os mesmos nas três suspensões: carboximetilcelulose sódica, propilenoglicol, sacarina sódica, metilparabeno, propilparabeno, álcool etílico, e água para injeção (Tabela 1). Suspensões são frequentemente utilizadas para formular substâncias com características organolépticas inadequadas. Por meio da minimização de fármaco em solução, a palatabilidade da formulação pode ser melhorada (EMEA, 2006). A sacarina sódica foi utilizada para melhorar o sabor. É considerada mais hidrossolúvel que a sacarina, e seu poder adoçante é de aproximadamente 300 a 600 vezes maior que a sacarose. A concentração utilizada na suspensão aquosa foi de 0,024%, de acordo com a faixa recomendada (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Por se tratar de um ambiente hospitalar, existe ainda o fato de que as formulações têm de ser aceitas pelos pacientes pediátricos. Propilenoglicol (PG) foi utilizada para melhorar a dispersibilidade do pó. PG é um agente levigante que diminui a tensão interfacial entre o líquido e o ar, e desta forma, facilita a penetração do solvente nos aglomerados de pó dispersos. Igualmente, a carboximetilcelulose sódica foi empregada como um agente suspensor, uma vez que este polímero forma uma camada hidrofílica ao redor das partículas

sólidas, promovendo sua molhabilidade (KULSHRESHTHA; SINGH; WALL, 2010). A concentração do polímero utilizada na suspensão aquosa (0,18%) está na faixa usual recomendada de 0,1% a 1%, e sua escolha está baseada também no fato de se tratar de um polímero aniônico, pois a atividade antimicrobiana do propilparabeno é consideravelmente reduzida na presença de surfactantes não iônicos, devido a resultante micelização do propilparabeno (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A água com qualidade de para injeção foi utilizada por sua disponibilidade no ambiente hospitalar, além de contribuir para a qualidade microbiológica das formulações pediátricas preparadas. Na suspensão aquosa veiculada, 1% de etanol foi necessário para solubilizar o metilparabeno e propilparabeno (SELVAM; ANDREWS; MISHRA, 2009).

No desenvolvimento de preparações farmacêuticas para uso pediátrico, algumas recomendações da Agência Europeia de Medicina (European Medicine Agency, EMA) devem ser seguidas (EMEA, 2006; MENDES et al., 2013). As formulações geralmente contêm conservantes, excipientes amplamente considerados como inertes para adultos, entretanto, podem gerar algum grau de toxicidade em pacientes pediátricos, quando múltiplas doses de medicações com o mesmo conservante são empregadas. Este é o caso particular do álcool benzílico e do ácido benzoico, os quais devem ser cuidadosamente avaliados e preferencialmente devem ser evitados (MCRORIE, 1996; EMEA, 2006). Os parabenos são efetivos em uma extensa faixa de pH e apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana. Neste estudo, a quantidade de parabenos utilizada na suspensão (total de 0,15%, sendo 0,1% de metilparabeno e 0,05% de propilparabeno) está na faixa recomendada de 0,1% a 0,5% (GLASS; HAYWOOD, 2006; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Adicionalmente, uma ação na atividade antimicrobiana já esperada foi obtida com a presença de outros excipientes como o propilenoglicol (2%), reduzindo a quantidade de conservantes necessários para uma formulação pediátrica estável.

Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar e, se necessário, melhorar a estabilidade físico-química e microbiológica das suspensões de anti-hipertensivos utilizadas em crianças hospitalizadas (contendo FRS, SPR ou HCTZ), aprimorando sua segurança e eficácia.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS E REAGENTES**

A matéria-prima FRS foi obtida dos Laboratórios IPCA (Índia), SPR da Tianjin Tyanuao (China) e HCTZ da Yuncheng Fenglingdu (China). A

carboximetilcelulose sódica (média viscosidade, 1500 – 2500 mPa.s, solução a 1% m/v) foi adquirida da empresa Denver Cotia Ltda (Brasil). Metilparabeno foi obtido da Alphaquimica (Brasil), propilenoglicol da Viafarma Ltda (Brasil), propilparabeno e sacarina sódica da Vetec (Brasil). Água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA). Metanol e acetonitrila grau cromatográfico (CLAE) foram obtidos da empresa Tedia (EUA). Fosfato de sódio e ácido fosfórico foram adquiridos da Nuclear (Brasil), ácido cítrico e álcool etílico foram obtidos da Vetec (Brasil).

## 2.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES

As suspensões pediátricas extemporâneas foram preparadas no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) com prazo de validade estimado em sete dias.

Quantidades suficientes de matéria-prima de FRS, SPR e HCTZ foram pesadas em balança analítica e transferidas para cálice graduado contendo propilenoglicol e suspensas por agitação (SELVAM; ANDREWS; MISHRA, 2009; KULSHRESHTHA; SINGH; WALL, 2010). Em seguida, o veículo da suspensão aquosa (Tabela 1) foi adicionado para obtenção de uma concentração final de 5 mg/mL. As suspensões foram gentilmente misturadas com um bastão de vidro de modo a dispersar uniformemente a fase interna dentro do meio de dispersão.

Para avaliar a influência das condições de armazenamento, as suspensões foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e sob refrigeração ( $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 7 dias.

As suspensões de FRS, SPR, HCTZ (pH 6,5) e HCTZ otimizada (pH 3,3) foram designadas como FRS-F1, SPR-F1, HCTZ-F1, e HCTZ-F2, respectivamente.

A solubilidade dos fármacos foi determinada em água e na suspensão. Quantidade equivalente de 5 mg/mL de fármaco foi suspenso nos solventes selecionados (água e solução aquosa) e deixados sob agitação magnética durante 24h. Logo após, a suspensão foi filtrada (0,45 mm) e o filtrado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação da solubilidade do fármaco. O teste foi realizado em triplicata.

## 2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC 10AVP (Kyoto, Japão) e foi baseada em métodos indicativos de estabilidade anteriormente validados, presentes na literatura. O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$  para todas as amostras. Para a análise de FRS-F1, a fase móvel foi composta de acetonitrila e ácido fosfórico a 0,1% (em água ultrapura) pH 3,0 (60:40; v/v) e eluída em fase reversa com coluna  $\text{C}_{18}$  Synergi Fusion (150 mm x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) Phenomenex (Torrance, EUA) a um fluxo de 1,0 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 233nm (BASAVAIAH; CHANDRASHEKAR, 2005; BOSCH et al., 2008).

Para análise da SPR-F1, a coluna empregada foi Phenomenex Synergi Fusion  $\text{C}_{18}$  (150 mm x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) com fase móvel constituída por metanol:água ultrapura (60:40; v/v) eluída em sistema isocrático com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 230 nm (HAUSS, 2007). Os experimentos com HCTZ-F1 e HCTZ-F2 foram realizados em coluna Phenomenex Synergi Fusion  $\text{C}_{18}$  (250 mm x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) a 40 °C utilizando como fase móvel tampão fosfato 0,1 M em água ultrapura (pH 3,0) e acetonitrila (70:30; v/v), eluídos a 1,3 mL/min com detecção em 254 nm (TAGLIARI et al., 2008).

Tabela 1. Componentes da suspensão aquosa.

<b>Excipientes</b>	<b>Função</b>	<b>Concentração (% m/v)</b>
Carboximetilcelulose sódica	Agente suspensor	0,18
Propilenoglicol	Dispersante e umectante	2
Sacarina sódica	Edulcorante	0,024
Metilparabeno	Conservante	0,1
Propilparabeno	Conservante	0,05
Álcool etílico	Cossolvente	1
Água para injeção	Veículo	qsp

## 2.4 PREPARAÇÃO DO PADRÃO E SOLUÇÕES DA AMOSTRA

Durante a preparação da amostra das suspensões o conteúdo destas foi dissolvido e analisado em CLAE. Primeiramente, as suspensões foram colocadas em agitação magnética durante 60 s para garantir a homogeneidade na hora da amostragem. A densidade relativa (25 °C) entre as amostras não foi estatisticamente diferente das respectivas soluções padrões, portanto a correção por peso não foi necessária para análise do volume requerido. Para a FRS-F1, HCTZ-F1 e HCTZ-F2 uma alíquota de 1 mL foi pipetada da suspensão e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL contendo 2 mL de metanol e colocado sob agitação em banho ultrassônico durante 10 min. O volume foi completado com fase móvel (concentração de 200 µg/mL) e a solução resultante foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm).

Para a análise de SPR-F1, uma alíquota de 1 mL foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, contendo 2 mL de metanol, e colocados sob agitação em banho ultrassônico durante 10 min. Completou-se o volume com fase móvel (concentração de 50 µg/mL), e a solução resultante também foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm).

Soluções padrões de trabalho foram preparadas conforme descrito anteriormente para as amostras, utilizando padrões de referência de FRS (Farmacopeia Brasileira, lote 1002), SPR (Farmacopeia Americana, lote KOF327) e HCTZ (Farmacopeia Brasileira lote 1003) para a concentração final de 200 µg/mL, 50 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente.

## 2.5 VOLUME DE SEDIMENTAÇÃO

Volume de sedimentação (F) foi determinado acondicionando 50 mL de cada suspensão, após agitação magnética por 5 min, em provetas mantidas a temperatura ambiente e sem agitação. O volume de sedimentação foi medido em intervalos de 2, 4, 6, 8, e 24 h e calculado utilizando-se a razão entre o volume final de sedimento em equilíbrio e o volume total de suspensão antes da sedimentação (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 2003).

## 2.6 REDISPERSIBILIDADE

Volumes fixos de cada suspensão (50 mL) em seus frascos originais foram armazenados durante 7 dias a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para a completa sedimentação. O tempo necessário para a total redispersão foi



determinado após as amostras serem misturadas com agitação moderada e o sedimento redistribuído, o resultado foi expresso em segundos.

## 2.7 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta foi determinado por anemometria laser-Doppler em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Amostras foram colocadas em cubeta específica onde o potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido e os valores de potencial foram calculados como a média da mobilidade eletroforética.

## 2.8 TAMANHO DE PARTÍCULA

As medidas de tamanho de partículas foram realizadas por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). O laser foi de 632,8 nm (He-Ne) e a faixa de detecção variou entre 0,02 a 2000  $\mu\text{m}$ , em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Devido às suspensões apresentarem uma variedade de partículas com diferentes índices de refração, o índice de refração do poliestireno de 1,59 foi utilizado (método de Mie). Cada frasco foi agitado e quantidade suficiente de cada suspensão foi adicionada ao Mastersizer até se obter uma intensidade de espalhamento de luz adequada (indicada pelo equipamento). O diâmetro médio  $d(4,3)$ , o qual é automaticamente calculado e relatado pelo equipamento, foi utilizado. O  $d(4,3)$  é definido como:

$$d_{(4,3)} = \frac{\sum n_i \times d_i^4}{\sum n_i \times d_i^3} \quad (1)$$

Em que  $n_i$  é o número de partículas por diâmetro  $d_i$ .

Estas análises foram realizadas após a manipulação e após 7 dias de armazenamento.

## 2.9 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A avaliação microbiológica foi realizada pelo teste de micro-organismos viáveis totais e pela pesquisa de patógenos específicos, segundo o recomendado pelos compêndios oficiais (HAUSS, 2007; USP, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Todos os testes foram realizados em duplicata utilizando uma primeira diluição ( $10^{-1}$ ) em caldo Leethen. Leethen é um caldo que contém lecitina de soja e polissorbato 80 (Tween 80), agindo como um diluente para inativar o efeito dos conservantes

presentes na formulação (metilparabeno e propilparabeno). O meio resultante denominado “Leethen” também contém enzima digestiva de tecido animal e extrato de carne para fornecer nitrogênio, carbono, vitaminas e minerais no caldo Leethen base. O cloreto de sódio presente mantém o balanço osmótico, enquanto que a lecitina neutraliza os compostos de amônia quaternária e, ainda, o polissorbato 80 neutraliza fenóis, hexaclorofenos, formalina e, juntamente com a lecitina, inativam o etanol. Os parabenos são inativados pelas fortes ligações de hidrogênio com polissorbato (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O teste para limite bacteriano foi preparado pipetando 1 mL da primeira diluição ( $10^{-1}$  em fluido Leethen) para placas de petri estéreis (duplicata). Imediatamente, 20 mL de Ágar Caseína Soja (previamente liquefeito e resfriado a aproximadamente 45 °C) foram adicionados às placas. As placas de petri foram fechadas e homogeneizadas por rotação. O conteúdo foi solidificado a temperatura ambiente e em seguida as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 72 h. O mesmo procedimento foi realizado para o teste de limite de fungos, bolores e leveduras, entretanto o meio utilizado foi o Ágar Sabouraud dextrose e as placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C.

O teste de pesquisa de patógenos específicos foi preparado utilizando 20 mL do Ágar Verde Brilhante (*Salmonella sp*), Ágar MacConkey (*Escherichia coli*), Ágar Cetrimide (*Pseudomonas aeruginosa*), e Ágar Vogel-Johnson (*Staphylococcus aureus*). As análises foram realizadas pela adição de 1 mL da diluição  $10^3$  da cultura de micro-organismos de 24 h feita na primeira diluição (amostras em fluido Leethen) e seguindo o procedimento do teste. As placas foram incubadas a 37 °C e observadas após 24 h.

O teste farmacopeico permite a ocorrência de não mais que 10 e 100 UFC/mL para fungos e bactérias, respectivamente, e requer a ausência de patógenos específicos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 ESTABILIDADE QUÍMICA

A estabilidade química de um fármaco em suspensão é normalmente controlada pelo fato de que a degradação está relacionada à concentração do fármaco em solução, em vez da concentração total de fármaco em suspensão (LIEBERMAN; RIEGER; BANKER, 1996).

No Hospital Universitário as suspensões extemporâneas são preparadas quando prescritas e, então, utiliza-se a matéria-prima para

preparação das formulações pediátrica, evitando-se assim, a trituração de comprimidos. As formulações anti-hipertensivas FRS-F1, SPR-F1 e HCTZ-F1 foram preparadas para utilização extemporânea, com vida útil estimada de 7 dias (tempo médio de duração do tratamento). Após a preparação, as propriedades físico-químicas foram determinadas e estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades da formulação de furosemida 1 (FRS-F1), formulação de espironolactona 1 (SPR-F1), formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2, respectivamente).

Formulação	pH	A: Solubilidade do		B: Solubilidade do		Razão entre A/B
		fármaco na suspensão		fármaco em água		
		(5 mg/mL)		(5 mg/mL)		
		( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	(%)	
<b>FRS-F1</b>	5,4	360	7,20	16,9	0,34	21,4
<b>SPR-F1</b>	6,4	5,81	0,12	26,3	0,53	0,22
<b>HCTZ-F1</b>	6,5	526	10,5	671	13,4	0,78
<b>HCTZ-F2</b>	3,3	501	10	671	13,4	0,75

Em geral, segundo a Farmacopeia Brasileira, suspensões orais devem conter não menos que 90% e não mais que 110% da quantidade de fármaco descrito no rótulo. Uma perda superior a 10% da concentração inicial de fármaco é considerado um indicador de instabilidade (HELIN-TANNINEN et al., 2001; HAUSS, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As quantificações dos fármacos foram realizadas de acordo com as metodologias previamente validadas por CLAE (BASAVIAH; CHANDRASHEKAR, 2005; HAUSS, 2007; TAGLIARI et al., 2008), as quais demonstraram ser específicas para quantificação do fármaco sem interferência dos excipientes e produtos de degradação. Com o objetivo de identificar os picos cromatográficos relativos ao metilparabeno e ao propilparabeno, estes compostos foram preparados em soluções mais concentradas e na mesma concentração que estão presentes nas formulações. Cromatogramas representativos da FRS-F1, SPR-F1, HCTZ-F1, e HCTZ-F2 obtidos após 7 dias de armazenamento são mostrados na Figura 2. A quantificação de todas as formulações em diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração) está sumarizada na Tabela 3, os resultados estão expressos como porcentagem residual de fármaco (%).

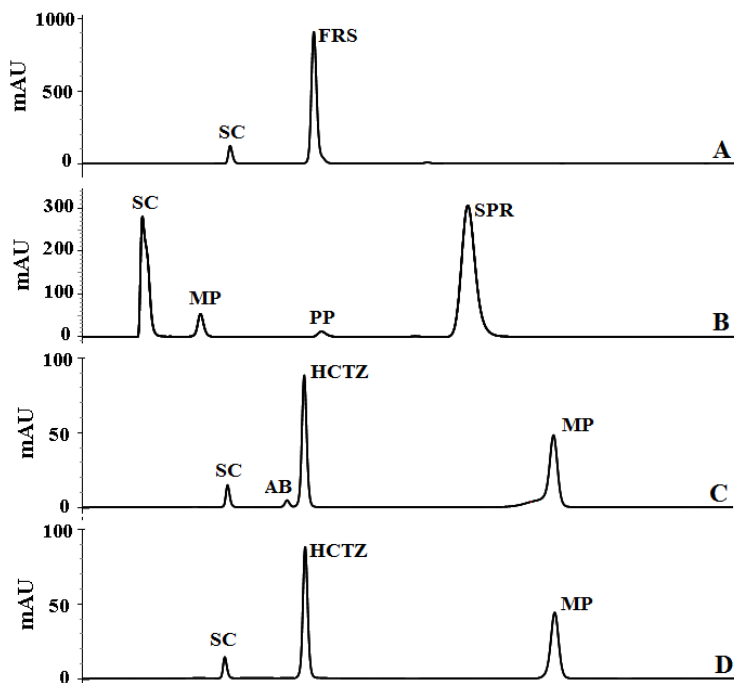


Figura 2. Cromatogramas representativos de (A): formulação de furosemidá 1 (FRS-F1); (B): formulação de espironolactona 1 (SPR-F1); (C): formulação de hidroclorotiazida 1 (HCTZ-F1); (D): formulação de hidroclorotiazida 2 (HCTZ-F2) após 7 dias. AB: aminoclorobenzenedisulfonamida. MP: metilparabeno; PP: propilparabeno; SC: sacarina sódica.

No caso de FRS-F1 e SPR-F1 nenhuma alteração significativa foi observada no perfil cromatográfico. Entretanto, de acordo com a tabela 3, é notória a rápida degradação da HCTZ-F1, que após 7 dias já revela uma diminuição maior que 10% da quantidade inicial de fármaco. HCTZ-F1 demonstra a baixa estabilidade da HCTZ em suspensão e, conseqüentemente, a necessidade de otimização da formulação. O cromatograma da HCTZ-F1 (Figura 2C) evidencia o aparecimento de um pico adicional, resultado da hidrólise pH-dependente da HCTZ. Esta instabilidade química é comumente observada para as tiazidas em soluções aquosas sendo o pH e a temperatura os principais fatores capazes de afetar a estabilidade da HCTZ (YAMANA et al., 1969; MOLLICA et al., 1971; ANGEL et al., 2005). Na faixa de pH entre 1,5 a 8,2, a estabilidade química

favorece a HCTZ em meios mais ácidos, e em soluções mais alcalinas, a hidrólise completa pode ocorrer (YAMANA et al., 1969; ANGEL et al., 2005). A literatura relata que a hidrólise da HCTZ gera irreversivelmente um produto com anel aberto, denominado aminoclorobenzenodisulfonamida (AB) (MOLLICA et al., 1971). Apesar da identificação do produto de degradação não ter sido realizada neste trabalho, o pico adicional observado foi atribuído a este produto AB, por estar muito bem descrito na literatura e ser o caminho de degradação mais provável nas condições apresentadas. A reação de hidrólise está demonstrada na Figura 3.

Tabela 3. Porcentagem residual de fármaco na Formulação de furosemida 1 (FRS-F1), Formulação de espironolactona 1 (SPR-F1), Formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2).

Formulação	Tempo (dias)	Teor <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>b</sup>	
		Temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	Temperatura da refrigeração (5 ± 3 °C)
FRS – F1	0	105 ± 0,22	105 ± 0,22
	7	101 ± 0,08	100 ± 0,32
SPR – F1	0	101 ± 0,05	101 ± 0,05
	7	97,6 ± 0,13	97,7 ± 0,08
HCTZ – F1	0	102 ± 0,10	102 ± 0,10
	7	90,8 ± 0,73	91,2 ± 0,35
HCTZ – F2	0	96,9 ± 0,56	96,9 ± 0,56
	7	99,2 ± 0,22	97,9 ± 0,71

<sup>a</sup> média de três determinações

<sup>b</sup> desvio padrão relativo

Neste contexto, visando a otimização da formulação, o pH da HCTZ-F1 foi ajustado de 6,5 para 3,3, por ser relatado como pH de estabilidade máxima para a HCTZ (MOLLICA et al., 1971). O pH foi alterado com uma solução aquosa de ácido cítrico a 2%. Este ácido foi escolhido por se tratar de um ácido bastante utilizado para ajuste de pH além de ser muito empregado na indústria alimentícia para melhorar o sabor, sendo assim, adequado para ingestão oral (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A melhora da estabilidade pode ser também atribuída ainda à mudança da solubilidade da HCTZ. Apesar da acentuada diminuição da

quantidade de fármaco na forma ionizada de pH 6,5 para pH 3,3 ( $pK_a$  de 7,9), a solubilidade da HCTZ, determinada experimentalmente, diminui apenas cerca de 5% (de 526  $\mu\text{g/mL}$  para 501  $\mu\text{g/mL}$  - Tabela 2). Pode-se notar, portanto, que a redução da solubilidade da HCTZ na formulação otimizada pode contribuir para a melhora da estabilidade, porém não é o principal fator.

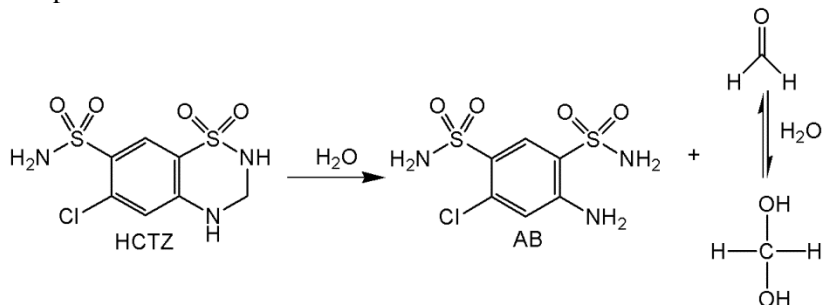


Figura 3. Reação de hidrólise da hidroclorotiazida (HCTZ) em meio básico gerando o produto aminoclorobenzenodisulfonamida (AB). Fonte: adaptado de Mollica e colaboradores (1971).

No pH 3,3 da HCTZ-F2, a carboximetilcelulose sódica não é um agente promotor da viscosidade. Neste caso, a HCTZ-F2 foi considerada adequada uma vez que se mostrou física e quimicamente estável pelo período de 7 dias. Caso uma formulação mais viscosa for necessária, sugere-se a alteração do polímero aniônico, carboximetilcelulose sódica, por um polímero não iônico, como a hipromelose, por exemplo.

A suspensão HCTZ-F2 demonstrou o mesmo perfil cromatográfico após 7 dias (Figura 2D), com teor de fármaco entre 96,89% - 99,19% (Tabela 3), comprovando um período de estabilidade maior. Apesar de a temperatura ser outro fator importante na estabilidade das suspensões, neste estudo as condições de armazenamento relacionadas à temperatura não influenciaram na estabilidade das suspensões. Pode-se perceber que o teor de fármaco para as suspensões armazenadas em ambiente refrigerado ou não refrigerado apresentaram-se muito similares (Tabela 3).

### 3.2 ESTABILIDADE FÍSICA

A estabilidade física é de grande preocupação em se tratando de preparações de curto prazo de armazenagem. Problemas como mudanças na morfologia das partículas, agregação e sedimentação irão refletir na dissolução do fármaco e conseqüentemente, na sua biodisponibilidade

(YAMANA et al., 1969; HELIN-TANNINEN et al., 2001; LI, G.; ZHANG, 2007; DEVENTER et al., 2009; ANGEL et al., 2005). Uma formulação de suspensão com adequado perfil de estabilidade física deve ser livre de separação de fases, compactação das partículas (fenômeno conhecido como caking), descoloração, entre outros. Se ocorrer sedimentação, a suspensão deve ser facilmente redispersa com agitação moderada (LI, G.; ZHANG, 2007).

### **3.2.1 Volume de sedimentação e redispersibilidade**

A FRS-F1 demonstrou um sedimento poroso e floculado, com valores de F diminuindo com o tempo, apresentando valor final de  $F = 28\%$  após 24 h. O sedimento da suspensão SPR-F1 foi floculado e consistente ( $F = 27,2\%$ , 24 h). Já a HCTZ-F1 apresentou um sedimento denso com um sobrenadante límpido ( $F = 19,6\%$ , 24 h), diferente da HCTZ-F2 que apresentou sedimento poroso e floculado ( $F = 29\%$ , 24h). Uma formulação com adequada estabilidade deve ser facilmente redispersa, como descrito anteriormente. Este fato pôde ser observado para todas as formulações, uma vez que os sedimentos foram redispersos após, no máximo, 22s de agitação leve, resultando em um sistema homogêneo.

### **3.2.2 Potencial zeta**

O potencial zeta é uma propriedade física exibida por qualquer partícula em suspensão como o resultado das cargas presentes, com suas forças de atração e repulsão. A magnitude do potencial zeta dará indicações da estabilidade do sistema (GREENWOOD, 2003).

Os valores de potencial zeta encontrados para FRS-F1 e SPR-F1 foram  $-3,19$  mV e  $-8,15$  mV, respectivamente. Estes resultados obtidos estão próximos da neutralidade e correspondem à instabilidade das amostras, característica de suspensões extemporâneas. Esta carga negativa em ambos os casos é resultante da carga superficial da carboximetilcelulose sódica ( $pK_a$  4,5), uma vez que o pH destas suspensões é maior que o  $pK_a$  do polímero.

Por se tratar do pH, fator fundamental para alteração do potencial zeta, as formulações de HCTZ foram avaliadas quanto a esta característica. A suspensão de HCTZ-F1 apresentou um potencial zeta de  $-48$  mV, e para formulação otimizada, HCTZ-F2, demonstrou um valor de  $-13,2$  mV. Diferentes valores de potencial zeta puderam ser observados para as suspensões de HCTZ-F1 e HCTZ-F2, e estão relacionadas à quantidade de fármaco na forma ionizada nos diferentes pHs (MOLLICA et al., 1971). Em pH 3,3 a molécula de HCTZ praticamente não existe na forma ionizada (CUDINA et al., 2005; BAKA; COMER; TAKACS-NOVAK, 2008).

Portanto, o alto valor negativo do potencial zeta para HCTZ-F1 resulta, em parte, da carga superficial da porção de fármaco ionizada. Além de que, quando o pH é ajustado para 3,3, o polímero (carboximetilcelulose sódica,  $pK_a$  4,5) torna-se não ionizado em sua maioria, diminuindo o valor do potencial zeta (-13,2 mV).

A HCTZ-F1 apresentou um valor mais negativo que a HCTZ-F2, ou seja, as forças de repulsão estão predominando frente às forças de atração das partículas. Neste caso forma-se um sistema defloculado, pois as partículas não se agregam e continuam preservando seu caráter individual. Este tipo de sistema, em repouso, pode formar um sedimento com compactação progressiva, o que pode dificultar a redispersibilidade da formulação. Estes resultados estão de acordo com o volume de sedimentação encontrado para esta formulação. Este volume é medido com apenas 24 h, o que pode ser um problema se a formulação ficar em repouso por muitos dias.

No caso da HCTZ-F2 (-13,2 mV), com o ajuste do pH houve a adição de íons de cargas opostas a formulação, suficiente para diminuir as forças elétricas de repulsão, em que as partículas podem começar a formar flocos. Este fenômeno é conhecido como floculação. Nos sistemas floculados, as partículas formam agregados frouxos, com baixo índice de compactação e facilmente redispersos. Portanto, o menor valor em módulo de potencial zeta da HCTZ-F2 demonstra ainda uma melhora da sua estabilidade física.

### **3.2.3 Distribuição do tamanho de partículas**

A difração a laser é uma das principais técnicas atualmente disponíveis para avaliação do tamanho de partículas na faixa entre submicrômetros a micrômetros, amplamente utilizada para estudos de estabilidade de tamanho de partícula de sistemas dispersos (SYROESHKIN et al., 2005; HAN et al., 2006). A mediana encontrada para as suspensões de FRS-F1, SPR-F1, HCTZ-F1 e HCTZ-F2 foi 141,2  $\mu\text{m}$  (Span de 2,795), 23,6  $\mu\text{m}$  (Span de 11,974), 128,4  $\mu\text{m}$  (Span de 1,935) e 217,9  $\mu\text{m}$  (Span de 1,785) após a preparação e cerca de 161,3  $\mu\text{m}$  (Span de 2,577), 39,0  $\mu\text{m}$  (Span de 9,282), 119,8  $\mu\text{m}$  (Span de 2,051) e 216,1  $\mu\text{m}$  (Span de 1,991) após 7 dias de armazenamento, respectivamente. Os gráficos representativos da distribuição do tamanho de partículas podem ser visualizados na Figura 4. O diâmetro médio das partículas não mudou durante o período do estudo de estabilidade, indicando que não ocorreram mudanças como uma grande agregação das partículas. A pequena flutuação da curva não é um indicativo de alteração no diâmetro das partículas, e sim pode ser atribuída a variação experimental desta técnica.



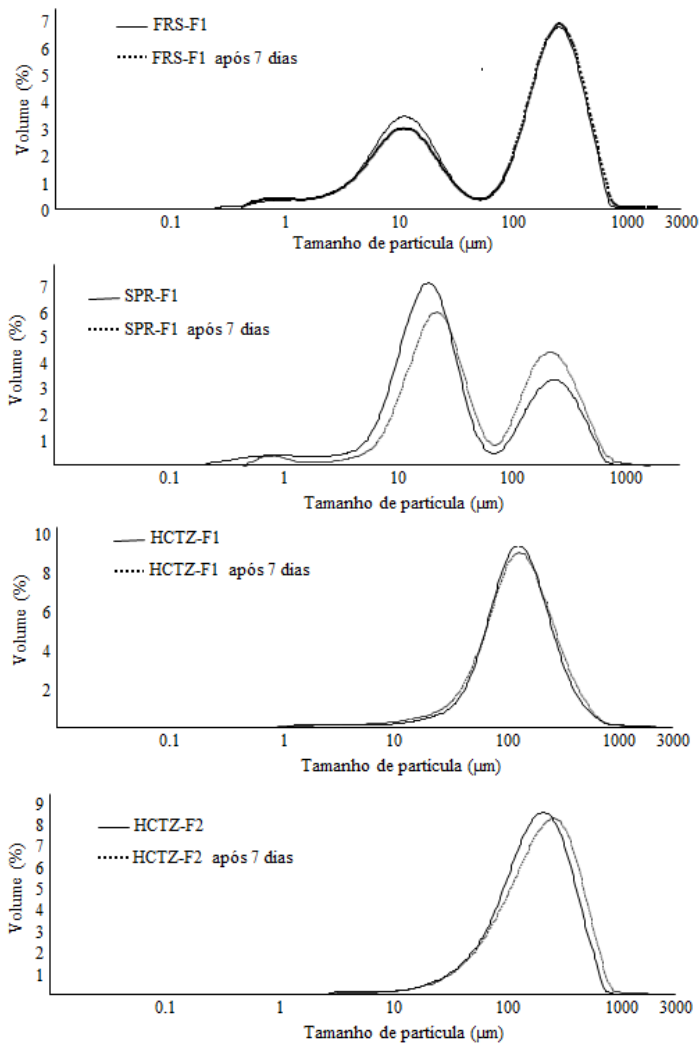


Figura 4. Gráficos da distribuição do tamanho de partículas dos fármacos na formulação de furosemida 1 (FRS-F1), formulação de espironolactona (SPR-F1), formulação de hidroclorotiazida 1 e 2 (HCTZ-F1, HCTZ-F2), realizados após preparação e após 7 dias de armazenamento.

### 3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Contaminação microbiana é outro problema importante relacionado à qualidade das suspensões. É fundamental que o número de micro-organismos presentes nas matérias-primas (biocarga) seja tão pequeno quanto possível, uma vez que, se as condições ambientais são favoráveis, os micro-organismos podem se multiplicar e subsequentemente causar mudanças na qualidade organoléptica do produto (odor e gosto desagradável, coloração estranha), diminuição da estabilidade e da atividade do fármaco e até mesmo produção de metabólitos tóxicos, como as micotoxinas. Muitos patógenos oportunistas que existem normalmente na natureza, podem provocar doença em humanos. Aqueles de maior risco de infecção são os neonatos e crianças, pessoas com imunossupressão, os enfermos e os idosos. Ademais, o metabolismo microbiano pode resultar em degradação química do fármaco e a ingestão de micro-organismos pode levar a uma infecção (DE LA ROSA; MEDINA; VIVAR, 1995; WOODS, 1997).

As suspensões farmacêuticas não precisam ser estéreis, porém certas formas de controle microbiológico são indispensáveis para garantir que tanto o consumidor quanto o produto não estejam expostos a níveis de risco inaceitáveis. Quando o meio dispersante da suspensão contém conservantes antimicrobianos, recomenda-se o estudo da estabilidade (ARNDT et al., 1999; HAN et al., 2006).

É crucial eliminar qualquer atividade residual do conservante na formulação farmacêutica para realizar uma análise precisa dos micro-organismos cultiváveis e viáveis. O caldo Leethen contém lecitina de soja e polissorbato 80 (Tween 80) que agem como diluente e inativam os conservantes da formulação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No presente estudo, após a análise microbiológica, nenhuma contaminação de micro-organismos viáveis e cultiváveis pôde ser detectada nas formulações, além da ausência de patógenos específicos (*Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). As suspensões pediátricas estão de acordo com os limites microbiológicos estabelecidos na farmacopeia, que permite a ocorrência de não mais que 10 UFC/mL e 100 UFC/mL para fungos e bactérias, respectivamente. A administração destas suspensões estudadas não acarretará na exposição dos pacientes pediátricos a um risco de infecção adicional.

Os resultados apresentados neste capítulo indicam que a qualidade microbiológica foi excelente e sugere que as formulações contendo FRS, SPR e HCTZ apresentaram estabilidade física, química e microbiológica.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Atualmente, estudos de suspensões pediátricas normalmente apresentam apenas dados da estabilidade química. Quando ambas as estabilidades físico-química e microbiológica são avaliadas, a qualidade da suspensão pode ser mais bem garantida. Suspensões de FRS e SPR provaram ser estáveis durante o período do prazo de validade estimado, de 7 dias. Para a suspensão contendo HCTZ, um ajuste de pH foi necessário para atingir o período de estabilidade desejado. Desta forma, demonstrou-se que as suspensões podem representar uma opção terapêutica segura para o tratamento de pacientes pediátricos no hospital.



---

---

**CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento de complexos de inclusão de hidroclorotiazida e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da permeabilidade**

---

---



## 1. INTRODUÇÃO

A HCTZ é um diurético da classe dos tiazídicos, descoberta em 1958 foi o primeiro fármaco realmente eficaz utilizada no tratamento de hipertensão arterial (RICHTERICH, 1958). A ação farmacológica constitui na atuação sobre o túbulo distal ligando-se ao sítio dos íons cloreto do sistema de cotransporte de sódio, inibindo sua ação e causando natriurese com perda de íons sódio e cloreto (RANG; RITTER; DALE, 2012). A pouca absorção da HCTZ no trato gastrointestinal deve-se às suas características de baixa solubilidade e baixa permeabilidade, sendo classificada pelo SCB como classe IV (AMIDON, G. L. et al., 1995; YU, L. X. et al., 2002; KASIM et al., 2004). Apresenta, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade (60% a 80%), com muita variação. O fármaco apresenta ainda problemas de instabilidade, como a hidrólise em solução aquosa, descrita por Mollica e colaboradores (MOLLICA et al., 1971).

A via oral é a via de escolha para administração de fármacos devido a sua simplicidade, conveniência e baixo custo. O comportamento in vivo de fármacos oralmente administrados dependerá das características de solubilidade e permeabilidade (YU, L. X. et al., 2002; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2010). Grande percentual de candidatos a fármacos apresentam falhas em estudos pré-clínicos, devido às propriedades inadequadas de absorção. Fármacos que pertencem à classe IV são os que apresentam maior dificuldade para a administração oral (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007).

Alterações podem ser feitas na formulação do medicamento para melhorar as características biofarmacêuticas sem partir para modificações moleculares, como síntese de sais ou ésteres solúveis em água. Existem técnicas laboratoriais promissoras em termos da modulação da liberação e absorção de fármacos (FLORENCE, A. T; ATTWOOD, 2003). Na área farmacêutica, a utilização de ciclodextrinas (CD) tem sido explorada principalmente no incremento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos. As CD constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos compostas por unidades de D-glucopirranose, que unidas originam estruturas cíclicas troncocônicas. As CD obtidas com maior rendimento, conhecidas como naturais, contém seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD), respectivamente (Figura 1) (VENTURINI et al., 2008). A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade

moléculas hidrofóbicas. A estabilidade dos complexos de inclusão pode ocorrer por ligações não covalentes, como as interações hidrofóbicas, efeitos eletrônicos, fatores estéricos e forças de Vander Walls (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; SÁ BARRETO; FIGUEIRAS *et al.*, 2009; MADY *et al.*, 2010; PATHAK *et al.*, 2010).

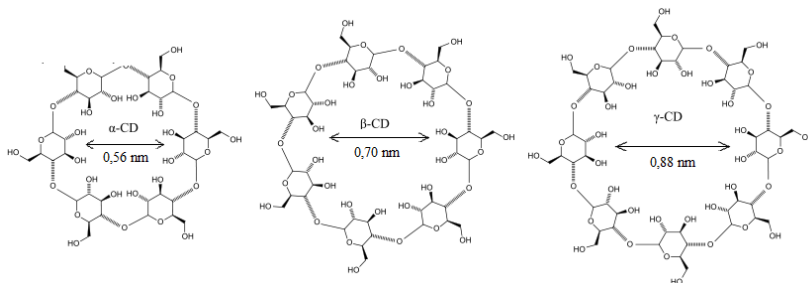


Figura 1. Estrutura representativa das ciclodextrinas. Fonte: adaptado de Venturini e colaboradores (2008).

Diversos estudos e investimentos nos últimos anos possibilitaram importantes reduções nos custos de produção viabilizando sua aplicação na indústria farmacêutica. Além das CDs naturais, surgiram promissores derivados semissintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a hidroxil-propil-β-CD (HPβCD), a hidroxil-propil-γ-CD (HPγCD), a sulfô-butil-éter-β-CD (SBβCD) e a metil-β-CD randomizada (RMβCD), ampliando suas possibilidades de utilização (RASHEED; KUMAR; SRAVANTHI, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007; GAMSIZ, 2010).

O aumento da biodisponibilidade de fármacos através da complexação com CDs é obtido devido ao incremento de solubilidade, dissolução, molhabilidade e permeabilidade que estes complexos promovem indiretamente ao fármaco “hóspede”. De uma maneira geral, as CDs funcionam como transportadores moleculares, carregando as moléculas hidrofóbicas “hóspedes” em solução até as membranas celulares lipofílicas (para qual apresentam maior afinidade), facilitando sua absorção (BRITTO; NASCIMENTO; SANTOS, 2004).

Devido ao problema de estabilidade da HCTZ detectado em formulações pediátricas atualmente utilizadas no HU-UFSC, somado às características de baixa solubilidade e baixa permeabilidade do fármaco, foi proposto um estudo de complexação da HCTZ com diferentes ciclodextrinas para melhora das suas propriedades biofarmacêuticas. Neste capítulo serão apresentados os estudos de desenvolvimento dos complexos



de inclusão, uma completa caracterização físico-química, bem como estudos de dissolução, permeabilidade *in vitro* e estudos de estabilidade em solução aquosa básica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

A HCTZ foi adquirida da Magistrale Farmácia de Manipulação (Florianópolis, Brasil) e as ciclodextrinas foram gentilmente doadas pela empresa Labonathus (Campinas - SP), representante nacional da Roquette Coporate (Lestem, França). Os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau de pureza cromatográfico.

### 2.2 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASE

O estudo de solubilidade de fases foi realizado conforme descrito por Higuchi e Connors (1965), onde excesso da HCTZ (10 mg) foi adicionado às soluções de concentrações crescentes de  $\beta$ CD ( $\beta$ -ciclodextrina 0-16 mM),  $\gamma$ CD ( $\gamma$ -ciclodextrina 0-123 mM) e HP- $\beta$ CD (hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 0 – 46 mM). As suspensões foram preparadas em diferentes valores de pH (3,3; 4,5; 5,5) (ajustado com solução de ácido cítrico a 2%) a fim de se manter a estabilidade do fármaco durante a complexação. A suspensão foi submetida à agitação a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até atingir o equilíbrio (24 h, determinadas experimentalmente).

A quantidade de HCTZ dissolvida foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian, Estados Unidos) a 273 nm em triplicata e as CDs não interferiram na quantificação do fármaco. O método de variação contínua (método de Job) foi realizado para a confirmação da estequiometria do complexo (JOB, 1928). A variação da intensidade de absorção ultravioleta da HCTZ foi plotada versus a fração molar ( $r$ ), representada na equação 1, numa faixa entre 0 e 1.

A constante de estabilidade aparente ( $K_c$ ) foi calculada a partir do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a equação 2, em que  $S_0$  é a solubilidade do fármaco na ausência da CD.

$$r = \frac{[HCTZ]}{[HCTZ]+[\beta CD]} \quad (1)$$

$$K_c = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1-\text{inclinação})} \quad (2)$$

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NO ESTADO SÓLIDO

Os complexos sólidos de HCTZ (297,74 g/mol) e  $\beta$ CD (1135,0 g/mol) foram preparados por diferentes processos: coevaporação, liofilização, malaxagem seguida de liofilização ou secagem por atomização (*spray-drying*). A mistura física do fármaco e ciclodextrina foi preparada como controle.

**2.3.1 Coevaporação.** Quantidades estequiométricas de HCTZ e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram solubilizadas em solução hidroalcolica (1:1 v/v), ajustado pH para 3,3 e colocados sob agitação a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até atingir o equilíbrio (24 h). A solução foi filtrada (0,45  $\mu\text{m}$ ) e seca em rotaevaporador a  $50^{\circ}\text{C}$  até completa evaporação do solvente, e o balão foi raspado para recuperação do sólido formado.

**2.3.2 Liofilização.** Quantidades estequiométricas de HCTZ e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram solubilizadas em água, ajustado pH para 3,3 e colocados sob agitação a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até atingir o equilíbrio (24 h). A solução foi filtrada (0,45  $\mu\text{m}$ ), congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 24 h e liofilizada em liofilizador Terroni LD 1500 (São Paulo – SP) por 24 h.

**2.3.3 Malaxagem.** Quantidades estequiométricas de HCTZ e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram misturadas em gral de porcelana por 20 min, após foi adicionado 1 mL de água ao pó e misturado por mais 5 minutos, esse procedimento se repete. A pasta formada foi colocada em um recipiente com 50 mL de água a  $40^{\circ}\text{C}$ , ajustou-se o pH da solução para 3,3 (com solução de ácido cítrico a 2% em água ultrapura) e foi colocado sob agitação magnética a esta temperatura por 20 min. Após ser filtrada (0,45  $\mu\text{m}$ ), a solução foi colocada para secar em liofilizador ou *spray-dryer*.

**2.3.3.1 Liofilização.** A solução resultante foi congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 24 h e liofilizada em liofilizador Terroni LD 1500 (São Paulo – SP) por 24 h.

**2.3.3.2 *Spray-dryer*.** A solução foi seca em mini *spray-dryer* B-290 (Buchi, Suíça), temperatura de entrada de  $180^{\circ}\text{C}$ , temperatura de saída de  $62^{\circ}\text{C}$ , fluxo de ar de 30 mL/min e pressão de 1,5 bar.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

### 2.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia com aquecimento e termogravimetria (TG)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) com a utilização de cápsulas de alumínio parcialmente fechadas com aproximadamente 2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 30 °C a 300 °C. O equipamento de DSC foi previamente calibrado com padrão de referência índio (ponto de fusão: 156,6 °C,  $\Delta H_{\text{fusão}} = -28,54$  J/g) e zinco (ponto de fusão 419,5 °C).

Ensaio de microscopia com aquecimento foram realizados em microscópio Olympus BX50 equipado com um Mettler Toledo FP-82 (Barueri – SP). As amostras foram aquecidas em razão de 10 °C/min até sua fusão total. Todo o processo foi filmado (software PVR plus). Todas as análises foram conduzidas como amostras secas. A calibração do equipamento foi realizada com padrão de referência cafeína (ponto de fusão: 235,6 °C  $\pm$  0,2 °C), benzofenona (48,1 °C  $\pm$  0,2 °C) e ácido benzóico (122,3 °C  $\pm$  0,2 °C).

A termogravimetria (TG) foi realizada em termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kioto, Japão) na faixa de temperatura de 30 °C a 600 °C, em cadinho de platina com aproximadamente 4 mg de amostra, atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min. O equipamento foi previamente calibrado com padrão de referência de oxalato de cálcio.

### 2.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

Os espectros IV foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil) na faixa entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 32 scans, na resolução do espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.3 Difração de raios-X de pó (DRX)

Para avaliação da cristalinidade, padrões de difração de raios-X foram obtidos em difratômetro modelo X<sup>3</sup>Pert (Philips, Holanda), tubo com ânodo de CuK $\alpha$ , voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, em intervalo de 5° a 40° (2 $\theta$ ), com tempo de passo de 5 s.

#### 2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME). As fotomicrografias da HCTZ, mistura física e os complexos foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Japão). As amostras foram fixadas em base metálica usando fita dupla-face, revestidas á vácuo em Polaron E 5000 e diretamente analisadas.

#### 2.5 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

A técnica de lavagem com solvente orgânico foi utilizada para detectar a formação de complexos verdadeiros e para determinar a quantidade de fármaco livre em estado sólido (HUSSEIN; TURK; WAHL, 2007). Este método baseia-se no fato de que a  $\beta$ CD e seus complexos são insolúveis em acetona, mas o fármaco livre é solúvel. Para determinar a quantidade de fármaco livre, uma alíquota (5 mg) de cada produto seco obtido foi misturada com acetona (5 mL). O sobrenadante foi separado e seco a vácuo na temperatura de 50 °C, reconstituído em fase móvel e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O teor de HCTZ complexado foi determinado dissolvendo o complexo, previamente lavado, com 400  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), e 9,6 mL de metanol. Após 12 horas, a  $\beta$ CD precipita e o sobrenadante foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm, removido, diluído em fase móvel e analisado em CLAE. A quantidade de HCTZ foi calculada de acordo com a equação 3.

$$\text{HCTZ complexada(\%)} = \left[ \frac{\text{quantidade de HCTZ complexada}}{(\text{HCTZ livre} + \text{HCTZ complexada})} \right] \times 100 \quad (3)$$

#### 2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação da HCTZ foi determinada por metodologia previamente validada por CLAE em fase reversa (Apêndice A). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD, detector UV-VIS modelo SDP-10AVP gerenciado pelo controlador SCL-10AVP. Utilizou-se coluna Luna 5 $\mu$  C18 Phenomenex (150 x 4,60mm e 5  $\mu$ m) mantida a 40 °C e detecção UV-VIS a 260 nm e pré-coluna (4.0 mm x 3.0 mm). A fase móvel utilizada foi composta por água (pH 3 ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila (80:20 v/v), eluída em um fluxo de 1mL/min e volume de injeção de 50  $\mu$ L.

## 2.7 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE HCTZ:BCD

O teste de solubilidade foi realizado com excesso de fármaco (10 mg), mistura física e dos complexos obtidos em 10 mL de água ou de fluido intestinal simulado (pH 6,8) e deixados sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente (25 °C) e temperatura corporal (37 °C). As amostras, em triplicata, foram filtradas em membrana de celulose 0,45 µm e a concentração de HCTZ solubilizado foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio – Varian, Estados Unidos) a 273 nm (ALEEM et al., 2008).

## 2.8 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O teste de dissolução foi realizado em 900 mL de fluido intestinal simulado sem enzimas (tampão fosfato de potássio 0,05 M - pH 6,8), mantidos a 37 °C ± 0,5 °C utilizando o aparato I (cesta), com velocidade de agitação de 75 rpm, em sextuplicata. Amostras equivalentes a 50 mg de HCTZ foram pesadas e acondicionadas em cápsula tamanho 0. A quantidade de HCTZ dissolvida foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio – Varian, Estados Unidos) a 273 nm.

Após o ensaio, foram avaliados os fatores  $f_1$  (fator de diferença) e  $f_2$  (fator de semelhança), calculados pelas equações 4 e 5 respectivamente:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n (Rt - Tt)}{\sum_{i=1}^n Rt} \right\} \cdot 100 \quad (4)$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (5)$$

Onde  $R_t$  e  $T_t$  são as porcentagens cumulativas dissolvidas a cada ponto de tempo selecionado do Referência e do Teste, respectivamente.

Valores de  $f_1$  maior que 15 (0-15) e  $f_2$  entre 50 e 100 implicam em similaridade entre os perfis de liberação. Sendo utilizado somente um ponto acima de 85% de fármaco liberado (MOORE; FLANNER, 1996; AHUJA; KATARE; SINGH, 2007).

## 2.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

Nos estudos *in vitro* de permeabilidade foi empregado o modelo de permeabilidade intestinal com células Caco-2. Células (ATCC # HTB 37)

foram cultivadas conforme recomendações de Hubatsch e colaboradores (2007) e padronização do laboratório (KRATZ et al., 2011). Para os experimentos de transporte, monocamadas celulares foram cultivadas em insertos com membranas permeáveis de policarbonato a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com uma densidade de 100.000 células por inserto, por um período entre 21 e 25 dias para permitir a diferenciação celular. A integridade da monocamada celular foi avaliada rotineiramente através da resistência elétrica trans-epitelial (TEER) e da permeabilidade ao Lucifer Yellow (marcador de integridade). Foram utilizadas apenas monocamadas com valores de TEER acima de 200 Ω/cm<sup>2</sup> e valores de permeabilidade ≤ 2,0 x 10<sup>-7</sup> cm/s. Os experimentos de transporte foram realizados na direção apical→basolateral (absortiva) e foi utilizado como tampão de transporte o tampão aquoso HBSS (pH 6,5 e 7,4 nos compartimentos apical e basolateral, respectivamente, a fim de mimetizar as condições *in vivo*). Em intervalos apropriados, alíquotas foram retiradas do compartimento receptor e um volume equivalente de tampão foi repostado. Ao final do experimento (2 h), alíquotas foram retiradas do compartimento doador para o cálculo do balanço de massa. As amostras foram quantificadas por CLAE (apêndice A). Os resultados são expressos como coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ), calculados de acordo com a equação 6, onde  $\Delta Q/\Delta t$  representa a taxa de permeabilidade (quantidade de amostra permeada por segundo);  $A$  é a área de difusão das células (filtro) e  $C_o$  é a concentração inicial da amostra (TAVELIN et al., 2003):

$$P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) \times 1/AC_o \quad (6)$$

## 2.10 ESTUDO DE ESTABILIDADE QUÍMICA

Estudo comparativo envolvendo a estabilidade da HCTZ livre, mistura física e do complexo de inclusão foram avaliados. Soluções foram preparadas em fluido intestinal simulado sem enzimas (tampão fosfato de potássio 0,05 M - pH 6.8) na concentração de 1 mg/mL e acondicionadas protegidas da luz a temperatura ambiente (25 °C). Em cada tempo de análise, as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 µg/mL em fase móvel e analisada por CLAE em metodologia previamente validada (apêndice A).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASES

O método de solubilidade de fases, descrito por Higuchi e Connors (1956), é a primeira ferramenta para verificação do aumento da solubilidade da HCTZ induzida pela adição do agente complexante (CDs) (HIGUCHI; CONNORS, 1965). O tempo de equilíbrio termodinâmico, determinado experimentalmente, foi de 24h, correspondente ao tempo necessário para se atingir o máximo de solubilidade da HCTZ. As representações gráficas da variação de solubilidade da HCTZ em função do aumento da concentração de diferentes CDs ( $\beta$ CD,  $\gamma$ CD e HP $\beta$ CD) são denominadas diagramas de fase. Estes diagramas foram obtidos em diferentes valores ácidos de pH (3,3; 4,5; 5,5), uma vez que valores de pH básicos podem levar à hidrólise da HCTZ, produzida neste ambiente, conforme descrito no capítulo 2.

O diagrama de fase obtido com  $\gamma$ CD e HP $\beta$ CD estão representados na Figura 2A, e com  $\beta$ CD a diferentes pHs na Figura 2B. O diagrama de equilíbrio que se estabeleceu durante a formação do complexo de inclusão com a  $\gamma$ CD e HP $\beta$ CD (figura 2A) foram similares e podem ser classificados como tipo B, ou seja, a formação de complexos é de solubilidade limitada e inferior à CD. O primeiro segmento da curva, segmento ascendente, representa a formação de um complexo responsável pelo aumento da solubilidade da HCTZ, similar ao que ocorre em diagramas do tipo A (descrito abaixo). Porém, a partir desta curva ascendente nota-se um limite de solubilidade da HCTZ, isto é, a adição de mais  $\gamma$ CD ou HP $\beta$ CD resulta na formação de mais complexo com conseqüente precipitação, e a concentração de HCTZ não complexada é mantida constante pela solubilização de HCTZ sólida.

O diagrama de fase obtido na presença de  $\beta$ CD (Figura 2B), nos diferentes valores de pH, entretanto, revelou um diagrama do tipo A. Este corresponde à formação de complexos solúveis, com aumento da solubilidade da HCTZ conforme aumento da concentração de  $\beta$ CD. Por se tratar de um diagrama linear, pode-se denominar pelo subtipo de diagrama, A<sub>L</sub>.

Segundo dados da literatura, a HCTZ apresenta dois valores de pK<sub>a</sub> (7,0 e 9,2) (KADAM et al., 2011). Portanto, dependendo do pH da solução aquosa, a HCTZ pode existir na forma neutra ou nas formas ionizadas (figura 3). O efeito da ionização do fármaco é aparente na formação de complexos de inclusão, observada na Figura 2B. Com a diminuição do pH, ocorre uma diminuição da fração ionizada de fármaco presente em solução. Em pH 3,3 praticamente não existe fármaco na forma ionizada (calculada

pela equação de Henderson-Hasselbalch – Equação 7). Esta condição da presença de espécie neutra em água favorece a formação de complexos de inclusão devido à característica apolar da cavidade da  $\beta$ CD, oferecida para o alojamento da molécula hóspede. Este estudo revela que ambas as formas ionizadas e não ionizadas interagem com a  $\beta$ CD, porém a interação da forma ionizada é mais fraca que da forma não ionizada. Resultados similares já foram descritos em estudo da complexação da tolbutamida (VEIGA et al., 1996).

Como valores de pH muito ácidos são capazes de causar hidrólise da CD (MIRANDA et al., 2011), o pH de 3,3 foi selecionado para produção dos complexos no estado sólido.

Diante de um segmento linear do diagrama de fase ( $A_L$ , Figura 1B), com uma inclinação da reta menor que 1, assume-se a formação de complexos de estequiometria 1:1 (M/M). Para confirmar a estequiometria de formação do complexo, o método de variação contínua, também conhecida como plotagem de Job, foi verificado (Figura 3). De acordo com este método, se existe um parâmetro físico diretamente relacionado com a concentração de complexo, este pode ser medido, desde que exista uma variação da fração molar contínua para os seus componentes (equação 7) (JOB, 1928; RAJARAM; SUNDARARAJALU; MEENAKSHISUNDARAM, 2011; TABLET; MATEI; HILLEBRAND, 2012). O parâmetro físico avaliado para este estudo foi a variação da absorbância a 273 nm (absorção máxima da HCTZ). A máxima concentração molar de complexo está presente na fração molar correspondente à estequiometria de complexação, neste caso, exatamente em 0,5 (Figura 4). Este valor corrobora com o encontrado no estudo de solubilidade de fase, ou seja, confirma a estequiometria de complexação de 1:1 (M/M).

Devido ao tipo de curva obtida para o diagrama, a constante de estabilidade ( $K_C$ ) pode ser determinada a partir da inclinação da curva e valor do intercepto (equação 2, equação de Higuchi e Connors) (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

$$pH = pk_a + \log_{10} \left( \frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

onde [HA] é a concentração molar da forma não ionizada e [A<sup>-</sup>] é a concentração molar da forma ionizada (PO; SENOZAN, 2001).



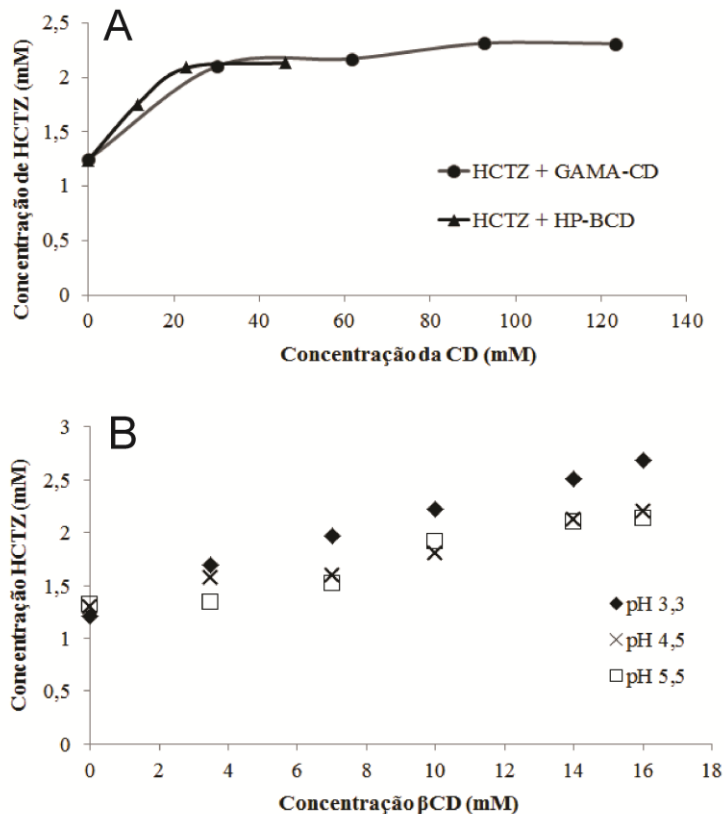


Figura 2. Diagrama de solubilidade de fases entre HCTZ e  $\gamma$ CD ou HP $\beta$ CD em pH = 3,3 (A), e HCTZ e  $\beta$ CD em pH 3,3; 4,5 e 5,5 (B); todos em solução aquosa a temperatura ambiente (25°C).

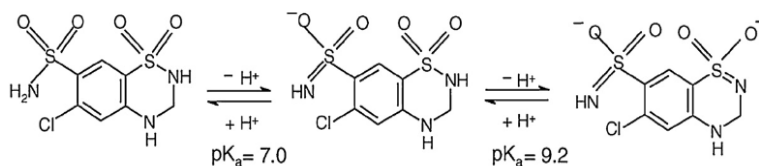


Figura 3. Representação esquemática da ionização da hidroclorotiazida em diferentes valores de  $pK_a$ . Fonte: adaptado de Kadam e colaboradores (2011).

Os valores de  $K_C$  obtidos para a HCTZ: $\beta$ CD, solubilidade intrínseca ( $S_0$ ), solubilidade máxima ( $S_{max}$ ) e eficiência de solubilidade ( $ES, S_{max}/S_0$ )

de acordo com os diagramas de solubilidade de fase estão representados na tabela 1.

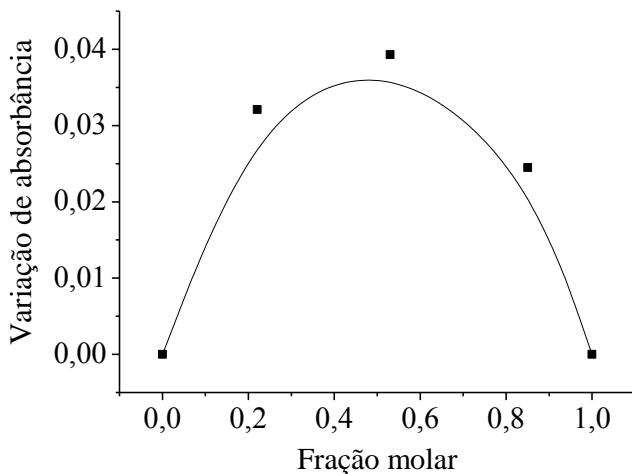


Figura 4. Plotagem de variação contínua (método de Job) para o complexo HCTZ:βCD (pH 3,3 a 25 °C, 273 nm).

Tabela 1. Dados do estudo de solubilidade de fases entre HCTZ:βCD 1:1 (M/M).  $K_C$  (constante de estabilidade),  $S_0$  (solubilidade intrínseca),  $S_{max}$  (solubilidade máxima), ES (eficiência de solubilidade).

Sistema	pH	$K_C$ ( $M^{-1}$ )	$S_0$ (mg/mL)	$S_{max}$ (mg/mL)	ES
HCTZ: βCD	3,3	177	0,36	0,80	2,2
HCTZ: βCD	4,5	45	0,38	0,65	1,7
HCTZ: βCD	5,5	36	0,39	0,63	1,6

Pode-se perceber que os valores da constante foram diminuindo à medida que aumenta o pH, revelando a sua menor interação com o fármaco conforme este vai sendo ionizado. Consequentemente, um maior grau de ionização apresenta maior hidrossolubilidade, demonstrado pela solubilidade intrínseca ( $S_0$ ).

Com estes estudos foi possível eleger a βCD como a CD com resultados mais promissores na solubilização da HCTZ, bem como

estabelecer a proporção molar entre a HCTZ:βCD de 1:1 (M/M) no pH mais adequado.

## 3.2 INTERAÇÕES ENTRE HCTZ E BCD

### 3.2.1 Análise térmica

A análise térmica é utilizada para estudos de compatibilidade entre matérias-primas, pois é capaz de definir o ponto de fusão das substâncias, assim auxilia na seleção dos excipientes adequados no estudo de pré-formulação. A figura 5 representa as endotermas obtidas para a HCTZ, mistura física e complexos obtidos por diferentes metodologias. A HCTZ (Figura 5A) apresenta um evento de fusão em 265,17 °C ( $\Delta H_{\text{fusão}}=123.38$  J/g) e a βCD (Figura 5B) revela um evento endotérmico em 115,58 °C ( $\Delta H=163,22$  J/g), evento proveniente da desidratação, ou seja, a liberação das moléculas de água alojadas na cavidade da CD. Esta liberação de água foi comprovada submetendo a amostra (CD) a um aquecimento até 200 °C, para o total desprendimento das moléculas de água, e em seguida, após a amostra ser resfriada, esta foi submetida ao 2º ciclo de aquecimento até 300 °C. Pode-se notar na Figura 6 que o evento é proveniente das moléculas de água, pois ocorre no 1º ciclo apenas, sendo que no 2º ciclo não existe outro evento. A liberação de água também é evidenciada por TG, conforme será descrito posteriormente.

A curva DSC obtida para a mistura física 1:1 (m/m) da HCTZ e βCD, observada na Figura 5C, é possível visualizar dois eventos endotérmicos, um em 114,32 °C e outro em 262,3 °C. Esta pequena diferença do ponto de fusão do fármaco em seu estado puro e na mistura física pode ser consequência de uma pequena interação entre o fármaco e a βCD, a solubilização do fármaco na CD com o aquecimento. Para eliminar a possibilidade de incompatibilidade, a análise de microscopia com estágio de aquecimento foi realizada.

A figura 7 representa as imagens capturadas durante o estudo, em que é possível observar a fusão do fármaco entre 264 °C e 266 °C (Figura 7 A2-A3) e o evento de perda de água da βCD entre 110 °C e 118 °C (Figura 7 B2-B3) em razão do embaçamento da lâmina. Apesar desta técnica não detectar um único valor de ponto de fusão, apenas uma faixa em que é possível notar este fenômeno, apresenta-se útil para a caracterização de interação entre o fármaco e a ciclodextrina. Por exemplo, as fotos C1, C2 e C3 apresentam os mesmos eventos observados para a HCTZ e a βCD quando estavam separados (Figura 7 A e B), indicando a ausência de incompatibilidade entre as amostras.

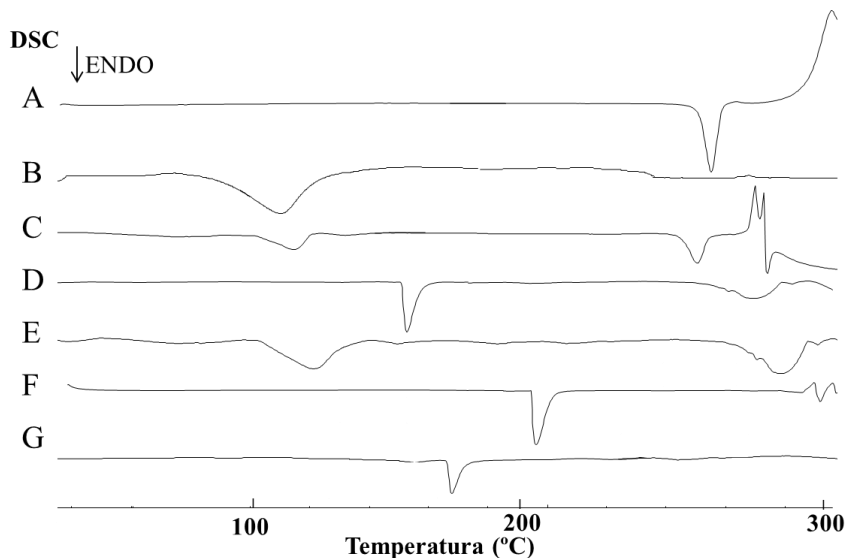


Figura 5. Curvas de DSC obtidas para HCTZ (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C) e diferentes métodos de preparação: coevaporado (D), liofilizado (E), malaxagem seguida de liofilização (F) malaxagem seguida de *spray-drying* (G).

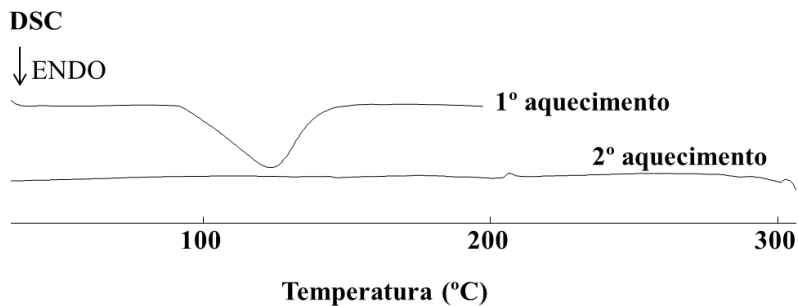


Figura 6. Curvas de DSC obtida para  $\beta$ CD. 1º aquecimento: 30 a 200 °C, 2º aquecimento: 30 a 300 °C.

A pequena diferença de temperatura observada nas curvas de DSC deve-se, portanto a uma pequena interação entre o fármaco e a  $\beta$ CD, já observada anteriormente por Li e colaboradores e também Delrivo e colaboradores (LI et al., 2005; DELRIVO; ZOPPI; LONGHI, 2011).

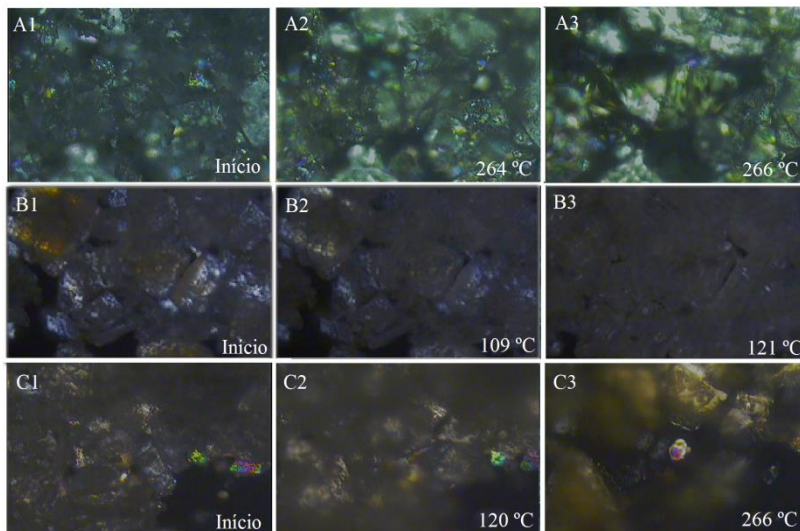


Figura 7. Ensaio de microscopia com estágio de aquecimento, em que A representa a hidroclorotiazida e A1 é na temperatura de 25 °C, A2 em 264 °C e A3 266 °C. B representa a  $\beta$ CD e B1 é na temperatura de 25 °C, B2 em 109 °C e B3 em 121 °C. C representa a mistura física e C1 é na temperatura de 25 °C, C2 em 120 °C e C3 em 266 °C.

A DSC é um método amplamente utilizado por necessitar de pouca amostra e prover resultados rápidos na caracterização de sistemas multicomponentes como os complexos de inclusão em seu estado sólido (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). Todas as endotermas obtidas para os complexos no estado sólido produzidos por diferentes metodologias (Figura 5D-G) demonstram a possível formação de um complexo de inclusão entre a  $\beta$ CD e a HCTZ, pois a endoterma de fusão característica da HCTZ diminui ou desaparece. Apenas o complexo obtido por liofilização apresentou um evento endotérmico próximo ao ponto de fusão da HCTZ, o que revela uma interação fraca entre a  $\beta$ CD e o fármaco complexados por esta técnica. Podem-se notar na figura 5, ainda, novos eventos endotérmicos em 166,24 °C ( $\Delta H=68,35$  J/g) para o coevaporado (5D), 123,58 °C ( $\Delta H=52,51$  J/g) para o liofilizado (5E), 205,1 °C ( $\Delta H=50,38$  J/g) para a malaxagem seguida de liofilização (5F) e 184,21 °C ( $\Delta H=129,98$  J/g) para a malaxagem seguida de *spray-drying* (5G). Estes resultados revelam que a molécula hóspede HCTZ adentrou na cavidade da  $\beta$ CD e algumas moléculas de água anteriormente ligadas em seu interior foram perdidas, manifestando diferentes graus de interação entre a HCTZ e a CD de acordo

com seu método de preparação. Este, por sua vez, vai refletir também na estabilidade térmica do complexo de inclusão formado, evidenciando maior estabilidade para os complexos, em ordem crescente: coevaporado (166 °C), malaxado seguido de *spray-drying* (184 °C) e malaxado seguido de liofilização (205 °C).

A termogravimetria (TG) é uma técnica analítica amplamente empregada em conjunto com a DSC para análise térmica de compostos. Uma análise sistemática das curvas TG (figura 8) demonstrou que a HCTZ decompõem em cerca de 366 °C (8A,  $\Delta m = 58,77\%$ ) e a  $\beta$ CD apresenta decomposição em 349,7 °C (8B,  $\Delta m = 76,55\%$ ). A perda de massa constatada para a  $\beta$ CD em cerca de 105 °C é relativa à perda de água da cavidade da CD, cerca de 9% (descrito na laudo da matéria-prima como porcentagem de água). A mistura física (Figura 8C) revelou uma interação dos compostos, com uma menor perda de água ( $\Delta m = 7\%$ ) e uma degradação em cerca de 310 °C, indicativo de uma pequena interação do fármaco com a ciclodextrina devido à diminuição da quantidade de água liberada da cavidade hidrofóbica (de 9% para 7%). O aquecimento é conhecidamente o responsável pelo aumento da interação entre molécula hóspede e CD, em vista disto é utilizado no método de malaxagem. Esta pequena interação evidencia uma diminuição da temperatura de degradação térmica para 310 °C, sinalizando uma diminuição da estabilidade térmica do fármaco na presença da CD.

Todavia, os complexos de inclusão exibiram uma estabilidade térmica maior que a encontrada para a mistura física, com exceção do produto coevaporado (8D) que apresentou temperatura de degradação similar (309 °C). A metodologia de coevaporação foi capaz de gerar um complexo de inclusão segundo o indicativo da curva de DSC, porém a estabilidade térmica observada foi semelhante a da mistura física.

O complexo liofilizado exibiu uma perda de massa de 8,04% em 55 °C, que pode ser atribuída às moléculas de água presentes na cavidade da  $\beta$ CD que não complexou com a HCTZ, como observado no DSC (Figura 5E). Os complexos obtidos por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying* manifestaram um evento de perda de água, que por se tratar de temperaturas muito baixas (54 °C e 70 °C, respectivamente) deve-se provavelmente a moléculas de água remanescentes do processo de secagem.

Para os produtos obtidos por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying* constatou-se, ainda, um aumento da estabilidade térmica do fármaco quando comparada a mistura física, em cerca de 320 °C para ambos. Estes resultados indicam que as propriedades térmicas usuais encontradas para a HCTZ foram alteradas após a formação do complexo de inclusão.

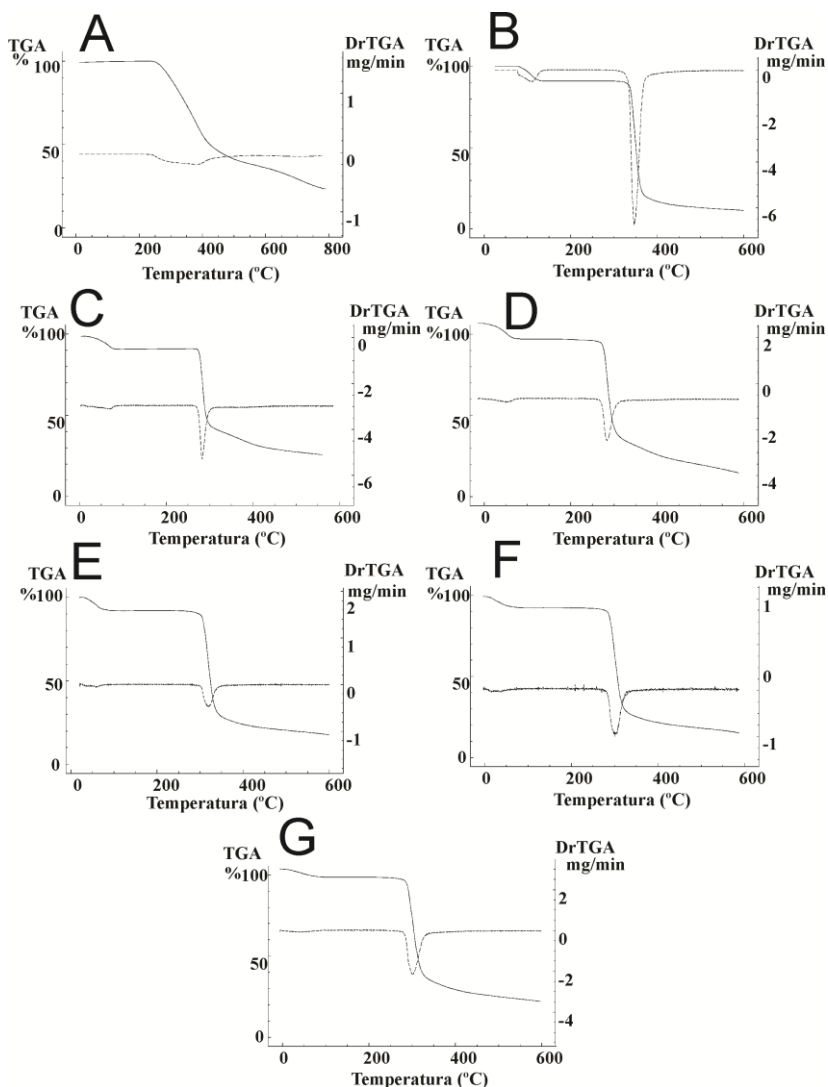


Figura 8. Curvas TG obtidas para HCTZ (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C) e complexos obtidos por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida de liofilização (F), malaxagem seguida de *spray-drying* (G).

### 3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma metodologia analítica que pode ser utilizada na avaliação de interações entre o

fármaco e a CD, em especial para fármacos que apresentem bandas de absorção características (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Com a utilização da espectroscopia do infravermelho é possível identificar as bandas características de absorção da HCTZ, figura 9. No espectro, as bandas visualizadas em  $3350\text{ cm}^{-1}$ ,  $3252\text{ cm}^{-1}$  e  $3148\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações de deformação axial dos átomos de nitrogênio presentes na molécula. A banda em  $3350\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação N-H pertencente ao grupo amina secundária, enquanto que a banda em  $3252\text{ cm}^{-1}$  deve-se às vibrações simétricas e em  $3148\text{ cm}^{-1}$  às vibrações assimétricas do grupo N-H da sulfonamida primária. Adicionalmente, outra banda característica e intensa em  $1602\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à sobreposição de bandas das ligações C=C do anel aromático e C-N. Ainda em  $1333\text{ cm}^{-1}$ ,  $1320\text{ cm}^{-1}$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  podem ser observadas as bandas correspondente ao grupamento  $\text{SO}_2$  da sulfonamida e a banda em  $1120\text{ cm}^{-1}$  está associada ao  $\text{SO}_2$  do anel heterocíclico.

A figura 10 apresenta todos os espectros obtidos para HCTZ,  $\beta$ CD, mistura física e seus complexos. A  $\beta$ CD (10B) na forma não complexada, apresenta moléculas de água em sua cavidade, como pôde constatado nos estudos de análise térmica, e estas ligações O-H são capazes de sofrer deformação originando a banda característica em  $1644\text{ cm}^{-1}$ . Os estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos OH localizados externamente a  $\beta$ CD podem ser notados em  $3300\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1500 - 1200\text{ cm}^{-1}$  o modo de deformação destes grupos no plano da  $\beta$ CD. A banda de estiramento da ligação C-H está presente em  $2926\text{ cm}^{-1}$  e as bandas em  $1146\text{ cm}^{-1}$  e  $1023\text{ cm}^{-1}$  representam as bandas de estiramento assimétrico de C-O-C. A mistura física (10C) é a sobreposição das principais bandas da HCTZ e da  $\beta$ CD. Para o complexo de inclusão obtido por liofilização (10E) é possível notar bandas características do fármaco e da  $\beta$ CD diferentemente dos outros complexos de inclusão. Este resultado confirma o observado no estudo de análise térmica que este método não foi capaz de incluir a maioria de HCTZ na cavidade da  $\beta$ CD.

Já para os outros métodos de obtenção de complexos de inclusão (Figura 10 D, 10F e 10G) pode-se notar uma diminuição ou até mesmo o desaparecimento total da banda em  $1643\text{ cm}^{-1}$ , indicando que a maior parte das moléculas de água da cavidade da  $\beta$ CD deu lugar ao hóspede HCTZ. Não é possível distinguir as bandas de estiramento das ligações N-H devido à sobreposição da banda do grupo O-H da  $\beta$ CD acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

É possível visualizar ainda nos espectros que são pouco perceptíveis as bandas de  $1333$  e  $1320\text{ cm}^{-1}$  do  $\text{SO}_2$  da sulfonamida, porém a banda em  $1150\text{ cm}^{-1}$  continua intensa em todos os complexos de inclusão formados, o que se pode inferir que o grupamento  $\text{SO}_2$  da sulfonamida não está incluído na



cavidade da  $\beta$ CD. Já o  $\text{SO}_2$  do anel heterocíclico anteriormente observado em  $1120\text{ cm}^{-1}$  já não pode mais ser notado, bem como a acentuada diminuição do sinal do anel aromático da HCTZ em  $1602\text{ cm}^{-1}$ , revelando a inclusão da porção heterocíclica e a quase total inclusão do anel aromático.

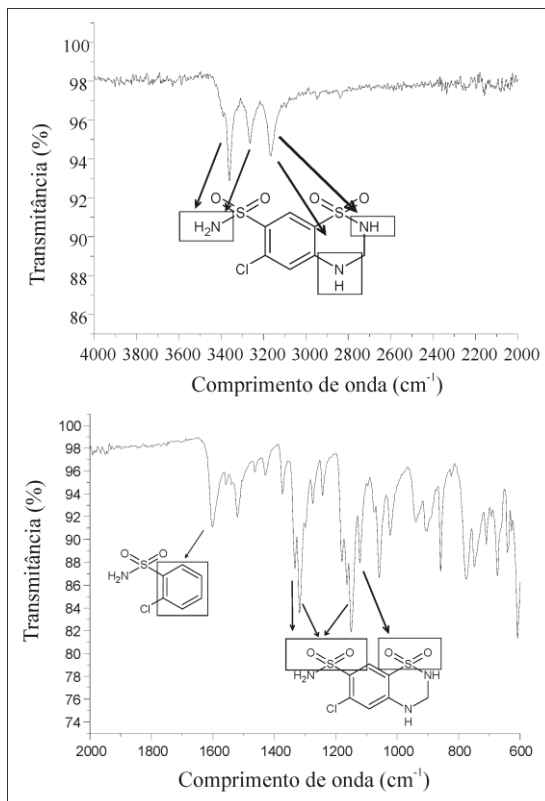


Figura 9. Espectro infravermelho obtido para HCTZ.

Baseado na espectroscopia de IV, uma proposta de como a HCTZ está inserida na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD está demonstrada na Figura 11. Esta determinação está de acordo com a encontrada por Granero e colaboradores por meio de determinação por modelagem molecular (ONNAINTY et al., 2012). Contudo, outra análise como a de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é necessária para confirmação exata de como a molécula está alojada na cavidade.

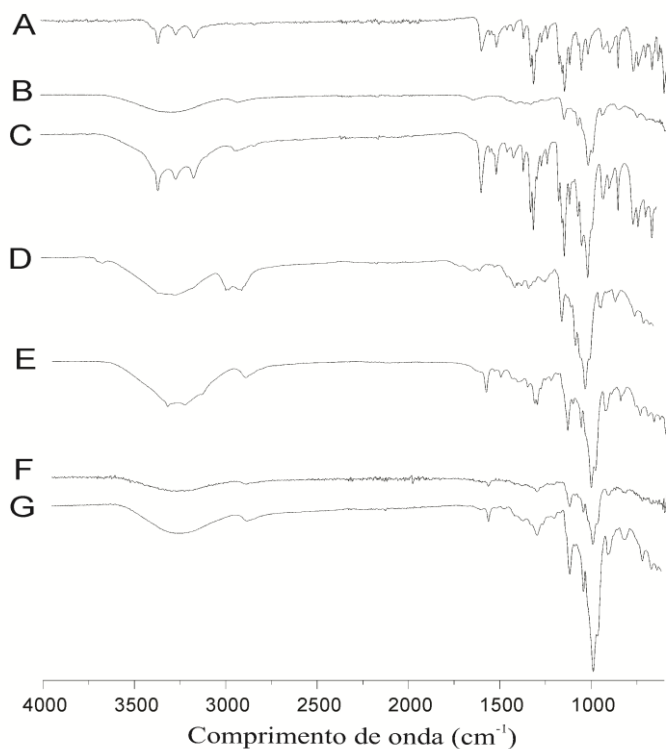


Figura 10. Espectros infravermelho obtidos para HCTZ (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C), e complexos obtidos por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida de *spray-drying* (G).

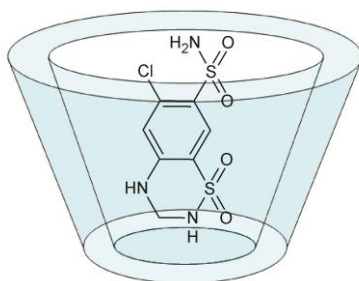


Figura 11. Representação esquemática do complexo de inclusão HCTZ/ $\beta$ CD, demonstrando a estrutura da HCTZ parcialmente inserida na cavidade da  $\beta$ CD.

### 3.2.3 Estudos de difração de raios-X de pó (DRXP)

DRXP é uma técnica usual para o estudo de complexação uma vez que os padrões de difração dos complexos são distintos da superposição dos componentes separados (SAMI; PHILIP; PATHAK, 2010). A figura 12 apresenta os padrões de difração obtidos para a HCTZ,  $\beta$ CD, mistura física e seus respectivos complexos de inclusão obtidos. O padrão de difração da HCTZ (figura 12A) foi caracterizado pela presença de picos cristalinos em 9,57; 16,63; 17,20; 18,67; 19,07; 20,86; 21,43; 24,6; 28,82; 35,8 e 37,5 ( $2\theta$ ). Já a  $\beta$ CD (12B) exibiu picos cristalinos característicos em 10,52; 12,39; 15,19; 16,91; 18,64; 20,77 e 22,56 ( $2\theta$ ). A mistura física revelou picos cristalinos da HCTZ e da  $\beta$ CD, porém com intensidades reduzidas (Figura 12C).

Todos os complexos de inclusão obtidos tiveram os difratogramas aproximados e ressaltados na parte direita da figura 12. O complexo obtido por coevaporação apresentou alguns picos característicos da  $\beta$ CD, entretanto, os picos de maior intensidade do fármaco não apareceram no difratograma 12D, e um pico adicional com intensidade alta pode ser evidenciado em 20,69 ( $2\theta$ ), indicando uma diminuição da cristalinidade da amostra e a inclusão do fármaco na cavidade da CD.

O produto obtido por liofilização (Figura 12E) demonstrou uma importante redução na cristalinidade da amostra, mas com a aproximação do difratograma é possível observar a manutenção de um pico cristalino da  $\beta$ CD, em 12,39 ( $2\theta$ ). Este resultado vai ao encontro da análise de IV, em que é possível identificar bandas características da  $\beta$ CD, bem como da análise por DSC que revelou uma menor interação do fármaco com a  $\beta$ CD, resultando na formação de um complexo na presença de moléculas de HCTZ e  $\beta$ CD na forma livre. Os complexos obtidos por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying* revelam alto grau de amorfização da amostra, ainda que com a aproximação dos difratogramas não seja possível destacar nenhum pico característico. O processo de secagem aumenta o grau de amorfização da amostra, porém o que contribui muito para esta característica foi o processo prévio de produção do complexo, a malaxagem. Este fato pode ser evidenciado comparando o difratograma E e F, em que apenas o processo de liofilização não foi o responsável pelo alto grau de amorfização da amostra F. Além de alterar as características de cristalinidade do complexo formado, a técnica de malaxagem aumentou o grau de interação entre o fármaco e a CD, resultado que corrobora com a análise de DSC, e irá interferir diretamente nas propriedades físico-químicas do complexo.

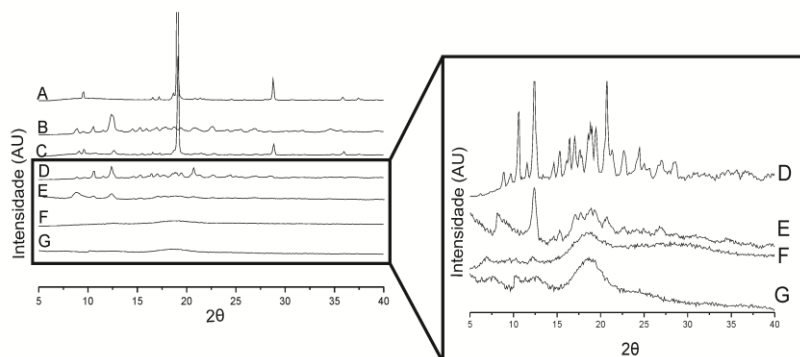


Figura 12. Difratogramas obtidos para o HCTZ (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C) e das amostras secas por: coevaporação (D), liofilização (E), malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida de *spray-drying* (G).

### 3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da microestrutura de materiais permite a observação dos aspectos morfológicos e fornece informações das propriedades físico-químicas (PRALHAD; RAJENDRAKUMAR, 2004; YANG et al., 2011). As análises da microestrutura da HCTZ, mistura física e os complexos de inclusão foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura e estão apresentadas na figura 13.

A HCTZ apresenta-se na forma de grandes e irregulares cristais (Figura 13A) enquanto que a  $\beta$ CD (Figura 13B) revela uma estrutura na forma de cristais poliédricos largos, sendo possível observar ambos os cristais na fotomicrografia da mistura física (13C). Todos os complexos de inclusão, observados de 13D a 13G, demonstram a formação de estruturas diferentes das observadas tanto para o fármaco, quanto para a  $\beta$ CD e sua mistura. Esta observação mostra a influência da técnica de preparação na morfologia do complexo obtido. O produto coevaporado (13D) apresenta-se na forma de cristais muito pequenos e diferente da mistura física, já observado no padrão de DRX e na alteração do ponto de fusão revelada no DSC. Os complexos de inclusão obtidos por liofilização (13E) e malaxagem seguida de liofilização (13F) demonstram morfologias similares, porém a DRX indica uma leve diferença, mas ambas com grau de amorfização devido ao processo de secagem (liofilização), com maior grau para o produto que foi previamente malaxado. O complexo obtido por malaxagem seguida de *spray-drying* (13G) revela uma amostra com alto grau de amorfização, observada na análise por DRX, sugerindo um formato de esferas, porém muito pequenas. Esta última forma pode ainda, gerar melhores

características de fluxo para possível desenvolvimento de uma forma farmacêutica.

As alterações drásticas observadas na forma das partículas, no seu aspecto e tamanho apontam para a existência de novas fases sólidas e corroboram com a formação de verdadeiros complexos de inclusão, já confirmada com as técnicas físico-químicas de caracterização, mais especificamente DSC, IV e DRX.

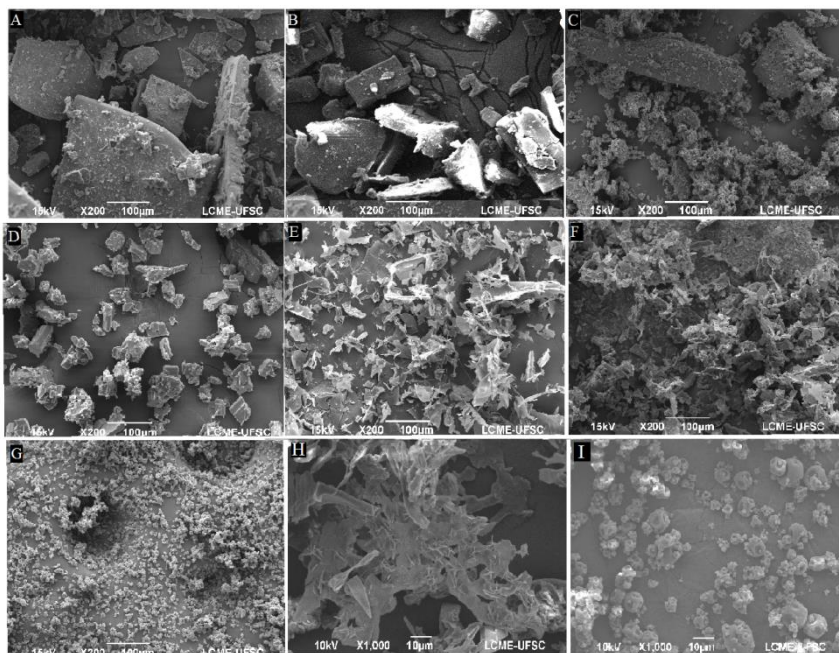


Figura 13. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o HCTZ (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D) liofilizado (E) malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida do *spray-drying* (G), ordem de magnificação de 200x, e malaxagem seguida da liofilização (F) e malaxagem seguida do *spray-drying* (G), ordem de magnificação de 1000x.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS OBTIDOS

A quantificação da HCTZ nos complexos foi realizada pelo método de lavagem com solvente. O método constitui na solubilização do fármaco livre em acetona e não solubilização do complexo neste mesmo solvente, permitindo a quantificação do fármaco livre. Para a quantificação de HCTZ complexada, utiliza-se o DMSO para desestabilizar o complexo e o metanol

para solubilizar o fármaco no meio, passível de ser quantificado. Para tanto, testes de solubilidade do fármaco e dos complexos foram realizados em ambos os solventes para garantir a solubilidade necessária. Os resultados da solubilidade da HCTZ em acetona revela um valor de 0,7 mg/mL. Este valor é mais do que o necessário encontrado em 5 mg de complexo, uma vez que devido a sua proporção molar de 1:1, em 5 mg de complexo existem apenas 1,04 mg de HCTZ possível de ser complexada. Esta HCTZ deve ser solubilizada em 5 mL de acetona (conforme metodologia), em que uma solubilidade de 0,2 mg/mL já seriam suficientes para solubilizar a HCTZ se toda ela estivesse na forma livre. A solubilidade do complexo em acetona é mínima (0,0023 mg/mL), não interferindo na quantificação do fármaco de forma significativa.

O fármaco complexado foi quantificado por CLAE conforme método validado (Apêndice A) e seus resultados são expressos em porcentagem (tabela 2). Da tabela, pode-se perceber grande quantidade de fármaco incorporado no complexo por todas as técnicas de preparação, exceto o produto obtido apenas por liofilização. Este complexo liofilizado apresentou, nas técnicas físico-químicas de caracterização, uma baixa interação entre o fármaco e a HCTZ. Desta forma, foi possível detectar o ponto de fusão do fármaco na curva DSC e bandas características da HCTZ e da  $\beta$ CD nos espectros de IV, por conseguinte apresentou baixa quantidade de fármaco incluído na cavidade da CD, sendo descartado dos estudos posteriores.

As outras técnicas de obtenção geraram complexos com grande quantidade de fármaco complexado, sendo um pouco mais efetivo o método de coevaporação e malaxagem seguida de *spray-drying*.

### 3.5 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS SÓLIDOS

A solubilidade dos sistemas binários entre HCTZ e  $\beta$ CD foi avaliada em água e em fluido intestinal simulado pH 6,8 (Tabela 2). O fluido intestinal foi selecionado devido à baixa absorção do fármaco no estômago, apresentando maior absorção no duodeno e porção superior do jejuno (WELLING, 1986). A HCTZ apresenta baixa solubilidade em água como esperado para fármacos classe SCB IV, e como observado anteriormente na solubilidade intrínseca ( $S_0$ ) do diagrama de fase, tabela 1. A presença da  $\beta$ CD não altera significativamente os valores da solubilidade do fármaco, independente do meio de solubilização utilizado.

Quanto aos complexos de inclusão, nota-se uma melhora da solubilidade em geral, pelos diferentes métodos de obtenção. O complexo obtido por liofilização foi descartado das análises por baixa quantidade de fármaco incorporado, o que reflete na solubilidade. O produto malaxado

seguido de liofilização, apesar de não ser o complexo com maior quantidade de fármaco incluído na cavidade da  $\beta$ CD, apresentou os melhores valores de solubilidade. O aumento de 103% e 129% observados para este complexo em água e fluido intestinal, respectivamente, pode ser explicado pelo aumento da molhabilidade deste pó, uma vez que se trata de um complexo com cristalinidade reduzida, constatada por DRXP e MEV. O produto coevaporado possui a maior quantidade de fármaco incorporado no complexo, porém apresenta-se na forma de pequenos cristais, observados no MEV, o que pode ter interferido em sua molhabilidade. O complexo obtido por malaxagem seguida de *spray-drying* apresentou quantidade de fármaco complexado semelhante ao coevaporado, porém com solubilidade maior, fato que advém da sua estrutura mais amorfa que o produto coevaporado, e menos que o produto malaxado e liofilizado. Todas as características físico-químicas determinadas para os complexos irão refletir no comportamento do sólido no estudo de dissolução.

Tabela 2. Quantificação da HCTZ na mistura física (MF) e complexos obtidos por coevaporação (COE), liofilização (LF), malaxagem seguida de liofilização (MLF) e malaxagem seguida de *spray-drying* (MSD).

	Quantidade de HCTZ	Solubilidade em água (25 °C)	Solubilidade em fluido intestinal simulado pH 6.8 (37 °C)
	(%)	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )
HCTZ	100 $\pm$ 0,5	37,2 $\pm$ 0,05	60,1 $\pm$ 0,05
MF	50 $\pm$ 0,9	38,8 $\pm$ 0,08	61,2 $\pm$ 0,04
COE	85 $\pm$ 2,2	70,7 $\pm$ 0,01	97,1 $\pm$ 0,05
LIO	23 $\pm$ 3,1	40,1 $\pm$ 0,06	72,9 $\pm$ 0,09
MLF	78 $\pm$ 1,1	75,2 $\pm$ 0,07	137,9 $\pm$ 0,09
MSD	84 $\pm$ 1,2	68,4 $\pm$ 0,04	105,1 $\pm$ 0,03

### 3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO

O estudo do perfil de dissolução nos estágios iniciais do desenvolvimento farmacêutico pode permitir a avaliação da qualidade de

diferentes formulações, comparação dos produtos obtidos por diferentes métodos e o grau de influência das mudanças relacionadas às formulações e a formação correspondente dos complexos (GRAY; ZHENG; SESI, 2009).

A Figura 14 ilustra o perfil de dissolução plotado a partir dos valores experimentais obtidos para HCTZ, mistura física, complexos de inclusão obtidos por coevaporação, malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*. Pode-se observar na figura cerca de 3 tipos de curvas distintas. A HCTZ e a mistura física (Figura 14 A e B) demonstram perfis de liberação muito similares, revelando que a presença da  $\beta$ CD não influencia no perfil de dissolução, da mesma forma que não interferiu no estudo de solubilidade do fármaco descrito anteriormente. Outro perfil que pode ser observado é para o complexo obtido por coevaporação (14 C), que se apresentou na forma de pequenos cristais com característica cristalina visualizada nas fotomicrografias e no difratograma. Devido a estas características cristalinas, apresenta um perfil de liberação gradual e característico deste complexo de inclusão, com uma liberação de cerca de 30% já no primeiro ponto (5 min), maior que a encontrada para o fármaco de 16%. A liberação do fármaco neste complexo ultrapassa 80% após 30 minutos de experimento, revelando a melhora da dissolução da HCTZ incluído na cavidade da CD, proporcionado pelas hidroxilas livres presentes na parte externa da  $\beta$ CD.

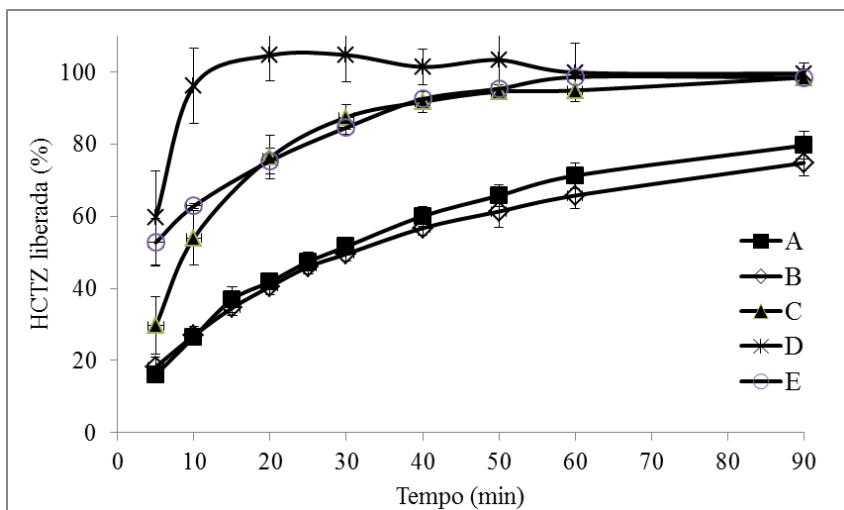


Figura 14. Perfil de dissolução obtido para a HCTZ (A), mistura física (B), coevaporado (C) malaxagem seguida da liofilização (D) e malaxagem seguida do *spray-drying* (E).



Diferentemente, os complexos de inclusão obtidos por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying* foram evidenciados por meio das técnicas físico-químicas com um maior grau de amorfização, o que levou a um alto grau de molhabilidade deste pó e refletiu no perfil de dissolução observado em 14D e 14E. Nota-se uma liberação inicial maior que 50% de HCTZ para ambos, atingindo-se a proximidade de 100% de liberação em apenas 10 minutos, no caso do complexo malaxado seguido de liofilização. O produto obtido por malaxagem seguida de *spray-drying* demonstrou uma liberação de mais de 80% em 30 minutos, semelhante ao coevaporado. Para comparação dos perfis de liberação dos fármacos com o da HCTZ, fatores de diferença e similaridade foram utilizados ( $f_1$  e  $f_2$ ), conforme proposto por Moore e Flanner (MOORE; FLANNER, 1996). Os valores obtidos podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado dos valores obtidos nas comparações dos perfis de dissolução dos perfis de diferença ( $f_1$ ) e similaridade ( $f_2$ ) entre a HCTZ e: mistura física (MF), coevaporado (COE), malaxagem seguida de *spray-drying* (MS).

Comparação	$f_1$	$f_2$
HCTZ x MF	5,60	74,20
HCTZ x COE	51,94	28,15
HCTZ x MS	94,15	14,87

Os fatores de diferença e similaridade medem a proximidade entre dois perfis de dissolução. Para as curvas serem consideradas similares, a agência internacional Food and Drug Administration (FDA) estabeleceu uma faixa padrão para os valores de  $f_2$  entre 50 e 100, e para serem consideradas diferentes o valor de  $f_1$  deve ser superior a 15% (MOORE; FLANNER, 1996; SHAH, V. P. et al., 1998). Desta forma, a HCTZ e mistura física apresentam perfis semelhantes, confirmando o fato de que a  $\beta$ CD não alterou o perfil de liberação do fármaco. Pode-se inferir ainda da Tabela 3, que todos os complexos obtidos apresentam diferença dos perfis de liberação, comprovando a melhora da dissolução do fármaco. Devido a grande quantidade de fármaco liberada em pouco tempo, é desnecessária a correlação entre a HCTZ e o complexo obtido por malaxagem seguida de liofilização.

### 3.7 ESTUDO DE PERMEABILIDADE *IN VITRO*

O complexo obtido por malaxagem seguida de liofilização apresentou-se como o sistema mais efetivo na melhora das propriedades de dissolução da HCTZ, selecionado, portanto para realização dos estudos de transporte em células Caco-2 com o objetivo de investigar o possível efeito na permeabilidade do fármaco. A HCTZ pura e a mistura física também foram avaliadas com o propósito de comparação.

O modelo de células Caco-2 foi escolhido para este estudo uma vez que se mostra adequado para simulação do transporte intestinal dos fármacos através das células, além de já ter sido utilizado com sucesso para modelo de permeabilidade de complexos com CDs (AGÜEROS et al., 2009; DAHAN et al., 2010; SZABADOS-NACSA et al., 2011).

Em todos os experimentos, o transporte do fármaco foi linear ao período de tempo estudado. Medidas de TEER foram realizadas antes e após os experimentos para verificar a integridade das junções entre as células e demonstrou que não ocorreu nenhum dano celular. Todos os valores obtidos foram maiores que  $200 \Omega \text{ cm}^2$ , indicativo de integridade da membrana celular. Adicionalmente, a incubação das monocamadas celulares com a CD isolada, nas mesmas concentrações presentes no complexo, não afetou a viabilidade e as propriedades de barreira das células, avaliada pelo marcador fluorescente “lucifer yellow”.

Os resultados estão sumarizados na Tabela 4 em termos de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) do lado apical para o basolateral. Nenhuma variação significativa dos valores de  $P_{app}$  ( $p > 0,05$ ) pôde ser observada entre a HCTZ, sua mistura física e seu complexo de inclusão. Este resultado sugere que a CD, nesta concentração, agiu somente como um promotor da solubilidade do fármaco e não revelou nenhum efeito significativo na abertura das junções intercelulares, ou seja, o processo de permeabilidade intestinal passiva, já descrito para esse fármaco, não foi afetado pelo processo de complexação com CD. Entretanto, a quantidade total de fármaco permeada em função do tempo foi muito maior para o complexo do que para a mistura física e HCTZ. Como a solubilidade aquosa do complexo é superior em comparação ao fármaco isolado, é possível teorizar que os complexos poderão apresentar uma biodisponibilidade *in vivo* superior devido a uma maior velocidade de solubilização do fármaco nos fluidos biológicos.

Tabela 4. Valores de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) através de células Caco-2 a 37 °C da HCTZ pura, mistura física (MF) ou na forma de complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização (ML).

Amostras	Permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) $10^{-7}$ (cm/s)	Quantidade total permeada ( $\mu\text{g/mL}$ )
HCTZ	4,37	0,11
MF	7,61	0,27
ML	5,82	0,37

### 3.8 ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE QUÍMICA

A quantificação das amostras submetidas ao estudo de estabilidade química em fluido intestinal simulado (pH 6,8) estão demonstradas na figura 15.

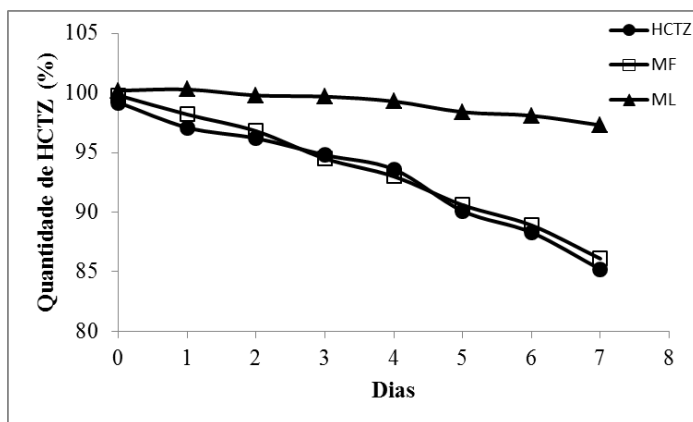


Figura 15. Gráfico representativo da quantidade de HCTZ determinada no estudo de estabilidade química quando as amostras de HCTZ, mistura física (MF) e complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização (ML) foram armazenadas em tampão intestinal simulado (pH 6,8) durante 7 dias.

Novamente, a amostra produzida por malaxagem seguida de liofilização foi eleita para este estudo devido a suas melhores propriedades observadas. A figura demonstra o efeito do pH na degradação da HCTZ livre, como anteriormente detectado nas suspensões aquosas de HCTZ (capítulo 2). Em 7 dias, uma degradação acentuada da HCTZ de 15%, enquanto existiu uma alteração mínima da quantidade de HCTZ não

degradada no complexo de inclusão (cerca de 3%). A mistura física apresentou uma resposta muito semelhante à HCTZ pura. Este resultado indica que a estabilidade química da HCTZ também foi melhorada quando inserida na cavidade da  $\beta$ CD formando um complexo de inclusão. Este foi capaz de proteger o fármaco da reação de hidrólise conhecida nesta faixa de pH.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As habilidades de solubilização e complexação da  $\beta$ CD para com a HCTZ puderam ser detectadas em diferentes técnicas de obtenção dos complexos de inclusão. Baseada na completa caracterização físico-química descrita neste capítulo, a formação de complexos de inclusão entre HCTZ e  $\beta$ CD, na proporção molar 1:1 foi confirmada. O complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização demonstrou comportamento superior no estudo da liberação do fármaco em fluido gastrointestinal simulado. Estudos de permeabilidade *in vitro* revelaram para este complexo uma maior quantidade de fármaco permeada em função do tempo, possibilitando importantes modificações biofarmacêuticas da molécula hóspede, como a melhora na biodisponibilidade. Além do fato da formação do complexo manter a integridade do fármaco frente a condições em que o fármaco puro sofre hidrólise. Desta forma, problemas de instabilidade do fármaco em solução podem ser evitados, o que eventualmente pode ter um potencial farmacêutico a ser explorado, como a sua veiculação destes complexos em formas farmacêuticas aquosas que podem ser administradas oralmente para pacientes pediátricos.

---

---

**CAPÍTULO 4 – Desenvolvimento de complexos de inclusão de norfloxacino e ciclodextrinas, caracterização físico-química e avaliação da atividade antimicrobiana**

---

---



## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, muita atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de estratégias que melhorem a biodisponibilidade oral de fármacos poucos solúveis em água (JUG et al., 2012; KAWAKAMI, 2012; LU; PARK, 2012). As propriedades físico-químicas como lipofilicidade e o  $pK_a$  são críticas na promoção da permeabilidade através da membrana plasmática e na solubilidade aquosa com o objetivo de obter uma dissolução eficiente e conseqüentemente, a absorção do fármaco (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). A estimativa dos fármacos atualmente no mercado com características de baixa solubilidade aquosa é cerca de 40%. Portanto, existe a real necessidade de estudos de desenvolvimento de sistemas com a capacidade de aumentar a biodisponibilidade dos fármacos (FAHR; LIU, 2007).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o NFX é classificado como classe IV, ou seja, apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON, G. L. et al., 1995; BREDA et al., 2009). De fato, uma dose usual de 400 mg, apenas cerca de 30-40% do fármaco é absorvido (AL-RASHOOD et al., 2000). Devido à sua baixa disponibilidade, altas doses diárias são necessárias, o que dificulta a aderência do paciente ao tratamento e aumenta o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos (PINA et al., 2010).

Para mudar este cenário, a complexação com as CDs tem se tornado uma opção atrativa, pois apresenta a capacidade de aumentar a solubilidade da molécula hóspede, além do fato de serem oligossacarídeos capazes de transportar as moléculas hidrofóbicas através da membrana celular lipofílica, levando conseqüentemente ao aumento da biodisponibilidade dos fármacos (MESSNER et al., 2010; KYZAS; LAZARIDIS; BIKIARIS, 2012; MACHÍN; ISASI; VÉLAZ, 2012). Além disso, as CDs protegem contra oxidação e degradações químicas e térmicas, aumentando sua estabilidade (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; IBRAHIM; EL-ZAIRY, 2009; MADY et al., 2010; PATHAK et al., 2010).

Muitas publicações descrevem diferentes técnicas e procedimentos para formação de complexos de inclusão entre fármacos e diferentes CDs. A maioria das técnicas resulta em melhora das propriedades físico-químicas quando comparadas ao fármaco puro. Em relação aos antibióticos, apesar do estudo da atividade antimicrobiana ser de extrema importância, não é rotineiramente avaliado em se tratando de complexos de  $\beta$ CD (DONOVA et al., 2007; ABUO-RAHMA; SARHAN; GAD, 2009; PATEL; JOSHI; PATEL, 2012). Estudos preliminares da formação de complexos de NFX e CDs têm sido descritos na literatura (GUYOT et al., 1995; DUA et al.,

2007; LI; ZHAO; CHAO, 2008). Entretanto, estes não incluem um completo estudo de diferentes métodos de complexação e de características físico-químicas, ou ainda sua influência na solubilidade do fármaco, dissolução e atividade antimicrobiana. O objetivo deste capítulo foi analisar diferentes tecnologias em obter complexos de inclusão de NFX com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) ou  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD) e o estudo do efeito do fenômeno de inclusão na atividade antimicrobiana e no perfil de dissolução.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

O NFX foi obtido da empresa Galena (lote 070560, São Paulo – SP) e as ciclodextrinas foram gentilmente doadas pela empresa Labonathus (Campinas - SP), representante nacional da Roquette Coporate (Lestem, França).

### 2.2 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASE

Conforme descrito no capítulo anterior, o estudo de solubilidade de fases foi realizado conforme descrito por Higuchi e Connors (1965), com excesso de NFX (10 mg) em soluções de concentrações crescentes de  $\beta$ CD (0-14 mM), HP- $\beta$ -CD (0-23 mM) e  $\gamma$ CD (0-13 mM). As suspensões foram preparadas em diferentes pHs (pH=3,0 a 9,0), ajustadas com ácido fosfórico 1M ou hidróxido de sódio (NaOH) 1M e a suspensão submetida à agitação a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até atingir o equilíbrio (96 horas determinadas experimentalmente).

A quantidade de NFX dissolvido foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian, Estados Unidos) a 275 nm e em espectrofluorímetro (Hitachi F4500, Japão) com  $\lambda$  de excitação em 330 nm e  $\lambda$  de emissão em 445 nm. O estudo foi realizado em triplicata e as CDs não interferiram na quantificação do fármaco. O método de variação contínua (método de Job) foi realizado para a confirmação da estequiometria do complexo (JOB, 1928). A variação da intensidade de emissão de fluorescência do NFX foi plotada versus a fração molar ( $r$ ), representada na equação 1.

A constante de estabilidade aparente ( $K_c$ ) foi calculada a partir do diagrama de solubilidade de fases, de acordo com a equação 2, em que  $S_0$  é a solubilidade do fármaco na ausência da CD.



$$r = \frac{[NFX]}{[NFX]+[\beta CD]} \quad (1)$$

$$K_c = \frac{slope}{s_0(1-slope)} \quad (2)$$

### 2.3 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

O estudo potenciométrico foi realizado em um titulador automático Metrohm, modelo 844 Titrimo Plus, em acetonitrila/água (1:1 v/v) devido à baixa solubilidade do composto em água. Utilizou-se eletrodo indicador de vidro e eletrodo de referência (Ag/AgCl), calibrado com solução de HCl (0,010 mol L<sup>-1</sup>) em acetonitrila/água e uma solução padrão de KOH (0,100 mol L<sup>-1</sup>) em água, para leitura direta de pH (p[H] = -log [H<sup>+</sup>]). As soluções foram preparadas com água (bidestilada previamente na presença de KMnO<sub>4</sub> e fervida) e acetonitrila, com a força iônica ajustada para 0,100 mol L<sup>-1</sup> com KCl. As medidas foram realizadas em célula termostatizada a 25,00 ± 0,05 °C, contendo o composto (0,05 mmol) em 50 mL de solução acetonitrila/água (50:50 % V/V), sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO<sub>2</sub> atmosférico. As soluções dos compostos tiveram o pH ajustados para próximo de 3,0 pela adição de 100 µL de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, resultando em um volume final aproximado de 50,01 mL e foram tituladas com solução padrão de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> com adições sucessivas de 0,05 mL até pH = 12,5 através do dosador automático do próprio equipamento. O valor de pK<sub>w</sub> da solução acetonitrila/água utilizado para os cálculos, foi 15,40 (HERRADOR; GONZÁLEZ, 2002). Os cálculos foram feitos com auxílio do programa BEST7 (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992).

### 2.4 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NO ESTADO SÓLIDO

Os complexos sólidos de NFX (319,34 g/mol) e βCD (1135,0 g/mol) foram preparados por diferentes processos: em solução, coevaporação, liofilização, malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*. A mistura física do fármaco e ciclodextrina foi preparada como controle.

**2.4.1 Em solução.** Quantidades estequiométricas de NFX e βCD (1:1 M/M) foram solubilizadas em água, ajustado pH para 3,0 e colocadas sob agitação a temperatura ambiente (25°C ± 2°C) até atingir o equilíbrio (96 h). A solução foi filtrada, distribuída em tubos e seca sob vácuo a uma

temperatura de 80 °C. Após a evaporação do solvente, os tubos foram raspados para recuperação do sólido formado.

**2.4.2 Coevaporação.** Quantidades estequiométricas de NFX e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram solubilizadas em solução hidroalcolica (1:1 v/v), ajustado pH para 3,0 e colocadas sob agitação a temperatura ambiente (25°C  $\pm$  2°C) até atingir o equilíbrio (96 h). A solução foi filtrada e seca em rotaevaporador a 50 °C até completa evaporação do solvente, e o balão foi raspado para recuperação do sólido formado.

**2.4.3 Liofilização.** Quantidades estequiométricas de NFX e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram solubilizadas em água, ajustado pH para 3,0 e colocados sob agitação a temperatura ambiente (25°C  $\pm$  2°C) até atingir o equilíbrio (96 h). A solução foi filtrada, congelada a -40 °C por 24 h e liofilizada em liofilizador Terroni LD 1500 (São Paulo – SP) por 24 h.

**2.4.4 Malaxagem.** Quantidades estequiométricas de NFX e  $\beta$ CD (1:1 M/M) foram misturadas em gral de porcelana por 20 min, após foi adicionado 1 mL de água ao pó e misturado por mais 5 minutos, esse procedimento se repete. A pasta formada foi colocada em um recipiente com 50 mL de água a 40 °C, ajustou-se o pH da solução para 3,0 e foi colocado sob agitação magnética a esta temperatura por 20 min. Após ser filtrada, a solução foi colocada para secar em liofilizador ou spray-dryer.

2.4.4.1 Liofilização. A solução resultante foi congelada a -40 °C durante 24h e liofilizada em liofilizador Terroni LD 1500 (São Paulo – SP) por 24 h.

2.4.4.2 *Spray-dryer.* A solução foi seca em mini *spray-dryer* B-290 (Buchi, Suíça), temperatura de entrada de 180 °C, temperatura de saída de 62 °C, fluxo de ar de 30 mL/min e pressão de 1,5 bar.

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

### 2.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia com aquecimento e termogravimetria (TG)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Kioto, Japão) com a utilização de cápsulas de alumínio parcialmente fechadas com aproximadamente 2 mg de

amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 30 °C a 300 °C.

Ensaio de microscopia com aquecimento foram realizados em microscópio Olympus BX50 equipado com um Mettler Toledo FP-82 (Barueri – SP). As amostras foram aquecidas em razão de 10 °C/min até sua fusão total. Todo o processo foi filmado, e usou-se para isso o software PVR plus.

A termogravimetria (TG) foi realizada em termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kioto, Japão) na faixa de temperatura de 30 °C a 600 °C, em cadinho de platina com aproximadamente 4 mg de amostra, atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de 10 °C/min.

### **2.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)**

Os espectros IV foram obtidos em equipamento FTIR Prestige (Shimadzu, Kioto, Japão) na faixa entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma média de 32 scans, na resolução do espectro de 4  $\text{cm}^{-1}$  em brometo de potássio (KBr).

### **2.5.3 Difração de raios-X de pó (DRX)**

Para avaliação da cristalinidade, padrões de difração de raios-X foram obtidos em difratômetro modelo X'Pert (Philips, Holanda), tubo com ânodo de  $\text{CuK}\alpha$ , voltagem de 40kV e corrente de 40 mA, em intervalo de 5° a 40° (2 $\theta$ ), com tempo de passo de 5 s.

### **2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Phillips modelo XL30 (Estados Unidos). As amostras montadas em base metálica usando fita dupla-face, revestidas com ouro (350 Å) em Polaron E 5000 e analisadas em MEV. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM – UFSC), no Departamento de Engenharia Mecânica – UFSC.

## **2.6 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO**

A técnica de lavagem com solvente orgânico foi utilizada para detectar a formação de complexos verdadeiros e para determinar a quantidade de fármaco livre em estado sólido (HUSSEIN; TURK; WAHL, 2007). Este método baseia-se no fato de que o  $\beta$ CD e seus complexos são insolúveis em n-hexano, mas o fármaco livre é solúvel. Foi utilizado o n-

hexano com 2% de ácido acético para facilitar a solubilização do NFX. Para determinar a quantidade de fármaco livre, uma alíquota (5 mg) de cada produto seco obtido foi misturada com n-hexano contendo 2% de ácido acético. O sobrenadante foi separado e seco sob vácuo na temperatura de 50 °C, reconstituído em fase móvel e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O teor NFX complexado foi determinado dissolvendo o complexo, previamente lavado com 400 µL de dimetilsulfóxido, em água acidificada (2 % de ácido acético). Após 12 horas, a βCD precipita e o sobrenadante é centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm, removido, diluído em fase móvel e analisado em CLAE. A quantidade de NFX foi calculada de acordo com a equação 3:

$$\text{NFX complexado}(\%) = \left[ \frac{\text{quantidade de NFX complexado}}{(\text{fármaco livre} + \text{fármaco complexado})} \right] \times 100 \quad (3)$$

## 2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação do fármaco foi determinada por metodologia previamente validada em CLAE em fase reversa, com detecção por fluorescência para doseamento do NFX em complexos de inclusão (Apêndice A). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD, detector UV-VIS modelo SDP-10AVP gerenciado pelo controlador SCL-10AVP. Utilizou-se coluna Luna 5µ C<sub>18</sub> Phenomenex (150 x 4,60 mm e 5 µm) mantida a 40 °C e detecção por fluorescência com 278 nm de excitação e 445 nm de emissão e pré-coluna (4.0 mm x 3.0 mm). A fase móvel utilizada é composta por tampão sódio hidrogeno fosfato 20 mM (pH 3 ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila (86:14 v/v), eluída em vazão de 1mL/min e volume de injeção de 20µL.

## 2.8 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE NFX:BCD

O teste de solubilidade foi realizado com excesso de fármaco (10 mg) e dos complexos obtidos em 10 mL de água ou de fluido intestinal simulado (pH 6,8) e deixados sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente (25 °C) e temperatura corporal (37 °C), em triplicata. As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45µm e a concentração de NFX solubilizado foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio – Varian, Estados Unidos) a 275 nm (ALEEM et al., 2008).

## 2.9 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

O teste de dissolução foi realizado em 900 mL de fluido intestinal simulado sem enzimas (tampão fosfato de potássio 0,05 M - pH 6.8), mantidos a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  com a utilização do aparato I (cesta), com velocidade de agitação de 75 rpm. Amostras equivalentes a 400 mg de NFX foram pesadas e acondicionadas em cápsula tamanho 0, em sextuplicata. A quantidade de NFX dissolvido foi determinada em espectrofotômetro (Cary 50 Bio – Varian, Estados Unidos) a 275 nm.

Após o ensaio, foram avaliados os fatores  $f_1$  (fator de diferença) e  $f_2$  (fator de semelhança), calculados pelas equações 4 e 5 respectivamente:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n (Rt - Tt)}{\sum_{i=1}^n Rt} \right\} \cdot 100 \quad (4)$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (5)$$

Onde  $Rt$  e  $Tt$  são as porcentagens liberadas em cada tempo.

Valores de  $f_1$  maior que 15 (0-15) e  $f_2$  entre 50 e 100 implicam em similaridade entre os perfis de liberação. Sendo utilizado somente um ponto acima de 85% de fármaco liberado (MOORE; FLANNER, 1996; AHUJA; KATARE; SINGH, 2007).

## 2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos complexos em estudo foi avaliada pelo método de difusão em ágar, como descrito por Froelich e Schapoval (1990) (FROEHLICH; SCHAPOVAL, 1990; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Culturas ativadas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, cultivadas em meio antibiótico 1 foram suspensos com 0,9% de salina e a suspensão obtida foi ajustada para  $25 \pm 2\%$  de transmitância a 580 nm, com o objetivo de obter o inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Para formar a camada base, alíquotas de 20 mL de Meio Antibiótico 11 foram colocadas em seis placas de Petri. Após sua solidificação, 5 mL do Meio Antibiótico 11, inoculados com o micro-organismo (0,7%) foram espalhados em cima da camada base. Após a solidificação, cilindros de aço foram colocados. Para cada cilindro, 150  $\mu\text{L}$  de solução padrão de NFX ou proporcional de solução de complexos de inclusão foram adicionados, nas concentrações de

10, 20 e 40 µg/mL. Após o período de incubação (32-35 °C por 16-18 h), os diâmetros das zonas de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Starret®, Brasil). Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando 6 placas para cada um. A potência antimicrobiana dos complexos de NFX foi calculada de acordo com a equação de Hewitt (equação 6) (HEWITT, 1977). A validade do modelo de linhas paralelas escolhido foi verificada por ANOVA (P = 0,05).

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } C \times 100 \text{ (6)}$$

Onde C é a concentração do fármaco.

## 2.11 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A formação do complexo de inclusão entre o NFX e βCD foi ainda investigada através de análises espectroscópicas de RMN. Para isso, os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e experimentos de Efeito Nuclear Overhauser foram realizados a 30 °C em D<sub>2</sub>O em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III HD 600, operando a 14,1 Teslas, observando o núcleo de <sup>1</sup>H a 600.13 MHz. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram adquiridos com 64K pontos, janela espectral de ~10,5 ppm, promovendo uma resolução digital de 0,19 Hz, tempo de reciclagem de 1s e acumulando-se 8 varreduras.

Os experimentos de RMN ROESY 1D foram adquiridos através da excitação seletiva dos núcleos em 3,84 e 3,74 ppm, correspondentes aos H-3 e H-5 da unidade de βCD, pela aplicação de pulsos seletivos de 180°. Os espectros foram adquiridos com 32K pontos, janela espectral de ~10,5 ppm, tempo de mistura de 400ms para a transferência de magnetização, tempo de reciclagem de 2s e acumulando-se 4k varreduras.

Os espectros de RMN 1H e ROESY 1D foram processados pela aplicação de uma multiplicação exponencial dos FIDs por fatores de 0,3 e de 1 Hz, respectivamente, seguido da transformada de Fourier. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, em relação ao sinal do TMS-*d*<sub>4</sub> em 0,00 ppm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE FASES

Para avaliação da solubilidade do NFX em concentrações crescentes de βCD, γCD e HPβCD em diferentes valores de pH, os diagramas de solubilidade de fase foram obtidos, como mostra a Figura 1. Observa-se que a solubilidade aparente do NFX aumenta linearmente em função da

concentração de  $\beta$ CD, correspondente a uma curva do tipo  $A_L$  de acordo com Higuchi e Connors (1965), enquanto que curvas do tipo Bs foram obtidas para  $\gamma$ CD e HP $\beta$ CD. Uma curva do tipo B indica que a formação do complexo de inclusão tem solubilidade aquosa limitada, enquanto que uma curva do tipo  $A_L$  corresponde à formação de complexos de inclusão solúveis em uma proporção molar 1:1 (NFX: $\beta$ CD). Os valores de pH influenciam na protonação de diferentes grupamentos da molécula, o que afetará a solubilidade e afinidade pela cavidade da CD. Devido às divergências/inconsistência de dados da literatura (ROSS; RILEY, 1990; YU, X.; ZIPP; DAVIDSON, 1994; MUSA; ERIKSSON, 2009), os valores de  $pK_a$  da molécula de NFX foram determinados experimentalmente. De acordo com a titulação potenciométrica, foi possível identificar quatro diferentes valores de  $pK_a$ , representados na Figura 2.

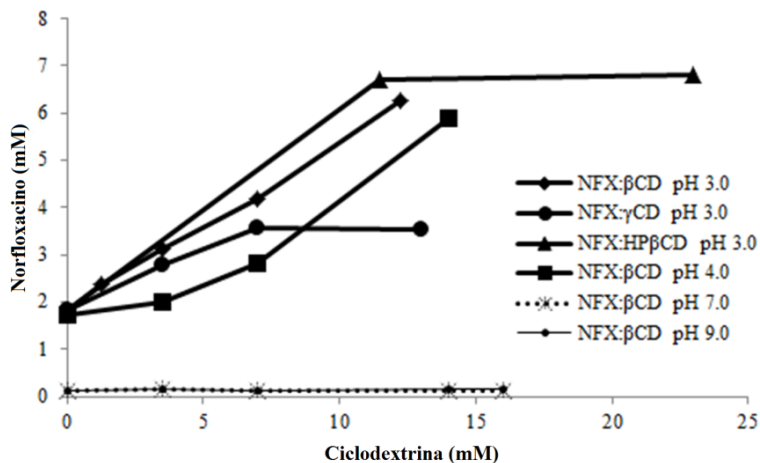


Figura 1. Diagrama de solubilidade de fases de NFX e  $\beta$ CD a diferentes valores de pH, e com  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, e HP $\beta$ CD em pH = 3,0, todos em solução aquosa a temperatura ambiente (25 °C).

Os estudos de solubilidade de fase foram investigados em quatro valores diferentes de pH. Os valores de pH de 3 e 4 foram ajustados com ácido acético (0,01M). De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch, em pH 3 existe um equilíbrio entre as formas A e B (56:44 %), e em pH 4 existe 11% de forma A e 89% de forma B. Após o ajuste de pH com ácido acético, as entidades A e B são convertidas em um sal de triacetato *in situ*; a forma B, entretanto, continua exibindo uma porção ionizada. Portanto, em pH 4, 90 % de NFX existe na forma ionizada

enquanto que em pH 3 apenas 44% está na forma ionizada. Para obter os valores de pH de 7 e 9, hidróxido de sódio (0,01M) foi utilizado. Em pH 7, 11% da entidade B e 87% da entidade C pode ser encontrada na forma de sal sódico, ambos existindo na forma ionizada (carga +3 e +2, respectivamente). Em pH 9, NFX existe em sua maioria na forma C (28%) e D (71%); estas espécies originam sais sódicos com uma carga resultante de +2 e +1, respectivamente.

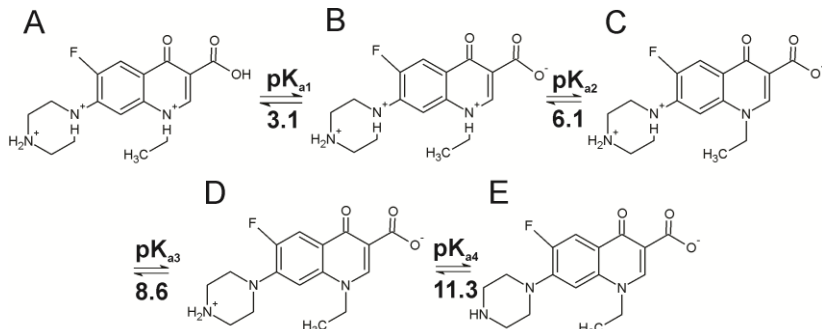


Figura 2. Estrutura do NFX com seus respectivos valores de  $pK_a$  determinados experimentalmente de cada grupamento químico passível de protonação.

Diante do exposto, em pH 4, 7 e 9 a molécula de NFX demonstra mais porções ionizadas que em pH 3, revelando um maior grau de hidrofiliicidade, o qual não é compatível com a inclusão na cavidade apolar da CD (LOFTSSON; BREWSTER, 2012). Em pH 3, a molécula apresenta-se com menor grau de ionização, a qual gera uma melhor afinidade com a cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD. Uma vez que a CD hidrolisa em meio fortemente ácido (MIRANDA et al., 2011), pH 3 foi selecionado para continuar os estudos

A extensão da complexação em meio aquoso é caracterizada pela constante de estabilidade ou de associação ( $K_c$ ), considerando-se a formação de complexos NFX: $\beta$ CD 1:1, a  $K_c$  foi calculada de acordo com a Equação 2 e o valor obtido foi de  $121,11 \text{ M}^{-1}$  para pH 3. Alguns autores estabelecem faixas ideais para valores de  $K_c$ , como entre 200 e  $5000 \text{ M}^{-1}$  (PITHA; SZENTE; SZEJTLI, 1983), todavia, complexos de inclusão com valores entre 7 e  $100 \text{ M}^{-1}$  já foram produzidos por muitos autores, tendo todos eles revelado melhores propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas que os respectivos fármacos isolados, portanto não sendo valores para exclusão do estudo. A solubilidade de fase em água na presença de 12 mM de  $\beta$ CD revelou um aumento de cerca de 4 vezes na solubilidade quando comparado ao NFX puro.



### 3.2 ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA

O espectro de fluorescência do NFX em solução aquosa está representado na Figura 3.

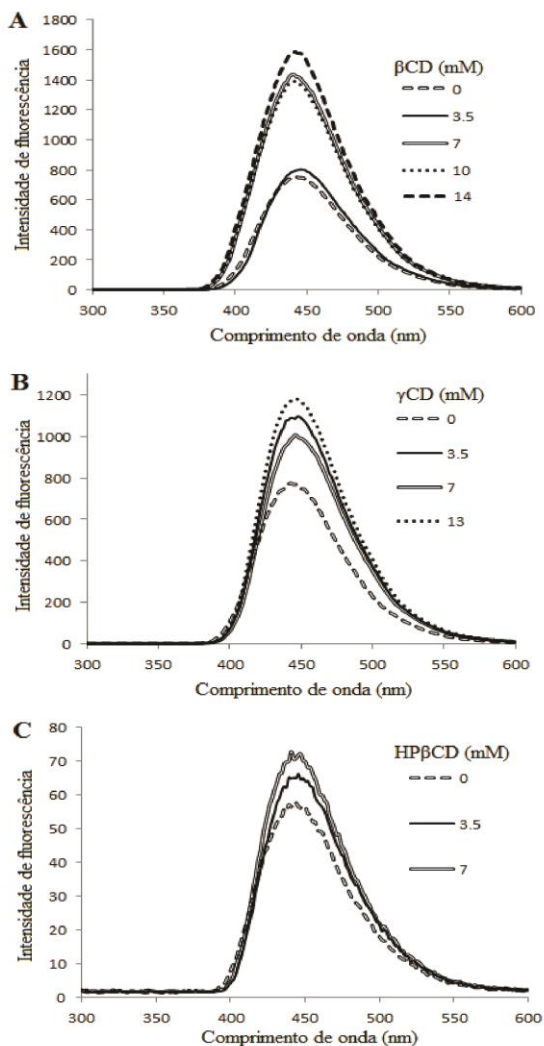


Figura 3. Espectro de fluorescência do NFX em presença de  $\beta$ CD (A),  $\gamma$ CD (B), e HP $\beta$ CD (C) em solução aquosa a temperatura ambiente (25 °C, pH =3,0).  $\lambda_{ex}$ = 330 nm e  $\lambda_{em}$ = 445 nm.

Nos espectros de fluorescência pode-se notar um aumento da intensidade de fluorescência quando na presença de qualquer CD. Uma análise mais crítica dos espectros demonstra que o maior aumento na intensidade de fluorescência foi obtido com a  $\beta$ CD, resultado que sugere a formação de complexos de inclusão entre o NFX e a  $\beta$ CD. Este polímero fornece uma cavidade hidrofóbica para inclusão da molécula de NFX, de modo que a forte interação entre os dois resulta em uma maior rigidez da molécula, conseqüentemente aumenta a intensidade de fluorescência emitida, como descrito por Li e colaboradores (2008) (LI; ZHAO; CHAO, 2008).

Além do mais, um pequeno deslocamento do comprimento de onda de emissão pode ser notado quando se compara o gráfico no NFX puro e do NFX na presença de  $\beta$ CD, também sugerindo a formação de complexo.

O método de Job foi realizado com o objetivo de confirmar a estequiometria do complexo, representada na Figura 4. A plotagem observada mostra um ponto máximo na fração molar a exatamente 0,5, confirmando a estequiometria do complexo NFX: $\beta$ CD é de 1:1 (M/M). Os estudos de fluorescência estão de acordo com os de solubilidade de fase e a  $\beta$ CD foi selecionada para produzir os complexos de inclusão no estado sólido.

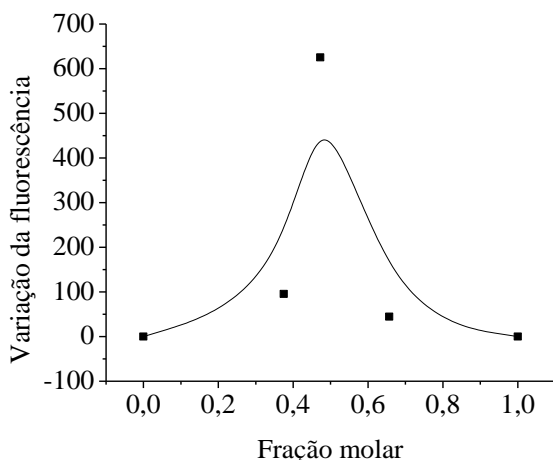


Figura 4. Plotagem de variação contínua (método de Job) para o complexo NFX: $\beta$ CD ( $\lambda_{ex}$ = 330 nm,  $\lambda_{em}$ = 445 nm, Slit ex/em=15 nm).

### 3.3 INTERAÇÕES ENTRE NFX E BCD

#### 3.3.1 Análise térmica

A DSC tem sido proposta como uma rápida ferramenta analítica para avaliação das interações físico-químicas entre fármacos e CDs por meio da comparação das endotermas obtidas na mistura física 1:1 (m/m) (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001; LI et al., 2005).

As curvas DSC obtidas para NFX,  $\beta$ CD, mistura física e amostras obtidas por diferentes métodos de secagem (sob vácuo a 80 °C, liofilização, coevaporação, malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*) estão demonstradas na Figura 5. A curva DSC para o NFX exibe um evento endotérmico em 217 °C ( $\Delta H$  fusão= -175.42 J/g) correspondente ao ponto de fusão do fármaco seguido de um evento exotérmico, característico do NFX. A degradação térmica do fármaco ocorre em dois eventos, um em 350 °C e outro em 430 °C, demonstrada pela curva TG do fármaco (Figura 7A). A curva DSC para a  $\beta$ CD contém um evento endotérmico a 99 °C ( $\Delta H$  = -244,55 J/g) associado provavelmente a perda de água da molécula. Este fato pode ser confirmado pela TG, em que a perda de massa nesta faixa foi cerca de 9%, o mesmo valor encontrado no laudo da matéria-prima, comprovando que na faixa de temperatura até 300 °C é o único evento que este polímero sofre. O mesmo tem sua degradação em torno de 350 °C, como pode ser visto na curva TG (figura 7B).

Ambos os eventos endotérmicos evidenciados nas matérias-primas separadas podem ser observados na mistura física (5C), o que demonstra a ausência de interação entre os dois componentes no estado sólido frente à taxa de aquecimento. Este fato foi comprovado com a utilização da microscopia com estágio de aquecimento (Figura 6). Esta técnica não tem sido muito explorada no âmbito dos complexos de inclusão, entretanto, permite a observação do comportamento dos pós durante o processo de aquecimento, e os resultados tornam possível o desenvolvimento dos complexos de inclusão. A análise da microscopia com estágio de aquecimento exibiu a fusão do NFX entre 215 °C e 221 °C (Figura 6A2 6A3). No caso do polímero, a condensação de água ocorreu entre 109 °C e 120 °C, visivelmente observada pelo embaçamento da lâmina que cobre a amostra (Figura 6B2 e 6B3). A mistura física manifestou o mesmo comportamento das amostras individualmente, com condensação de água em torno dos 100 °C, observada por um leve embaçamento da lâmina, e o evento de fusão do fármaco entre 215 °C – 220 °C, o que exclui a existência de incompatibilidade farmacêutica entre o fármaco e a CD e torna favorável o desenvolvimento de complexos de NFX com a  $\beta$ CD.

Em contraste com as endotermas apresentadas para a mistura física, em todas as curvas dos produtos obtidos no estado sólido (5D-H) é possível observar um deslocamento, perda de intensidade e/ou desaparecimento da endoterma de fusão do NFX, indicativo da possível formação de complexo de inclusão entre fármaco e a CD. Na curva DSC 5F, 5G e 5H o evento endotérmico a 217 °C, correspondente à fusão do NFX, desapareceu, e coincide com o aparecimento de um novo evento endotérmico em cerca de 140 °C, 160 °C e 160 °C, respectivamente, para o produto coevaporado (5F), malaxagem seguida de liofilização (5G) ou por *spray-drying* (5H). O NFX, molécula hóspede, entra na cavidade da  $\beta$ CD e altera a energia por meio da formação do complexo de inclusão, o que explica o deslocamento para temperaturas maiores (140 °C e 160 °C).

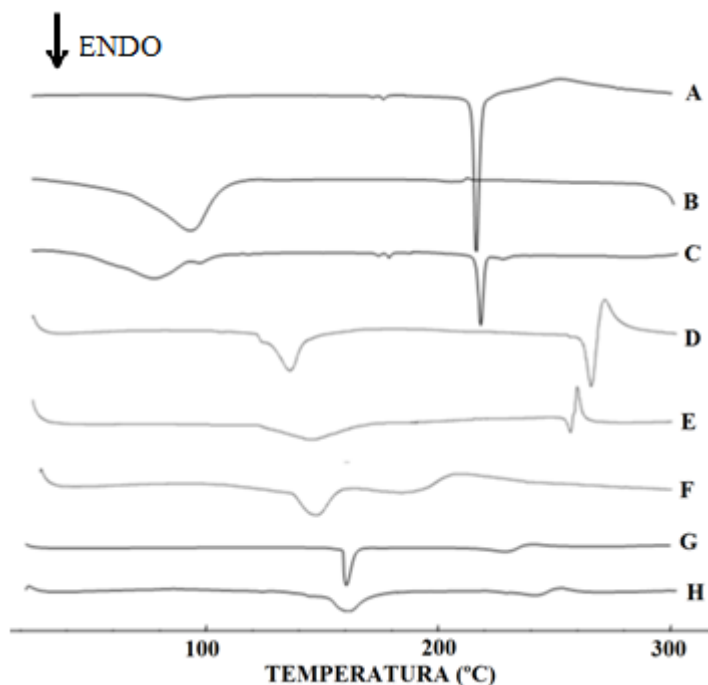


Figura 5. Curvas de DSC obtidas para NFX (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C) e diferentes métodos de secagem: vácuo a 80 °C (D), liofilizado (E), coevaporado (F) malaxagem seguida de liofilização (G) malaxagem seguida de *spray-drying* (H).

Na comparação dos complexos por meio da TG, ocorre uma diferença da temperatura de degradação encontrada nos complexos de inclusão, que

sugere que as amostras de NFX/ $\beta$ CD obtidas por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying* são menos estáveis termicamente que o produto obtido por coevaporação.

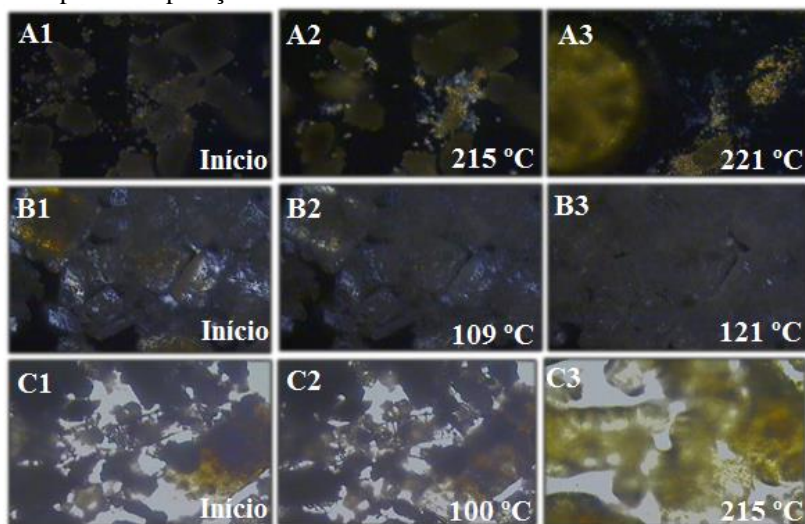


Figura 6. Microscopia com aquecimento obtida do NFX (A),  $\beta$ CD (B) e mistura física (C).

Representado na figura 7D-F o produto coevaporado (7D) apresenta sua degradação térmica em valores acima de 290 °C ( $\Delta m = 43,7\%$ ), enquanto que a malaxagem seguida de liofilização (7E) ou *spray-drying* (7F) mostra evento inicial de degradação em 284 °C ( $\Delta m = 33,9\%$ ) e 264 °C ( $\Delta m = 42,2\%$  de massa), respectivamente. Ainda nesta análise pode-se observar que o processo de coevaporação e o processo de liofilização mantém certa quantidade de água nas amostras, cerca de 10% para a coevaporação (7D) e 8% para a liofilização (7E), enquanto que a operação com o *spray-drying* demonstra uma secagem mais eficiente. Pode-se inferir que esta perda de massa em temperaturas abaixo de 100 °C para ambas as amostras é provavelmente de água remanescente do processo de secagem devido ao seu desprendimento da molécula a baixas temperaturas. Os outros métodos (Figura 5D e 5E) não foram efetivos na complexação da maioria das moléculas de NFX, pois ainda apresentam o evento de fusão do fármaco, sendo excluídas do estudo.

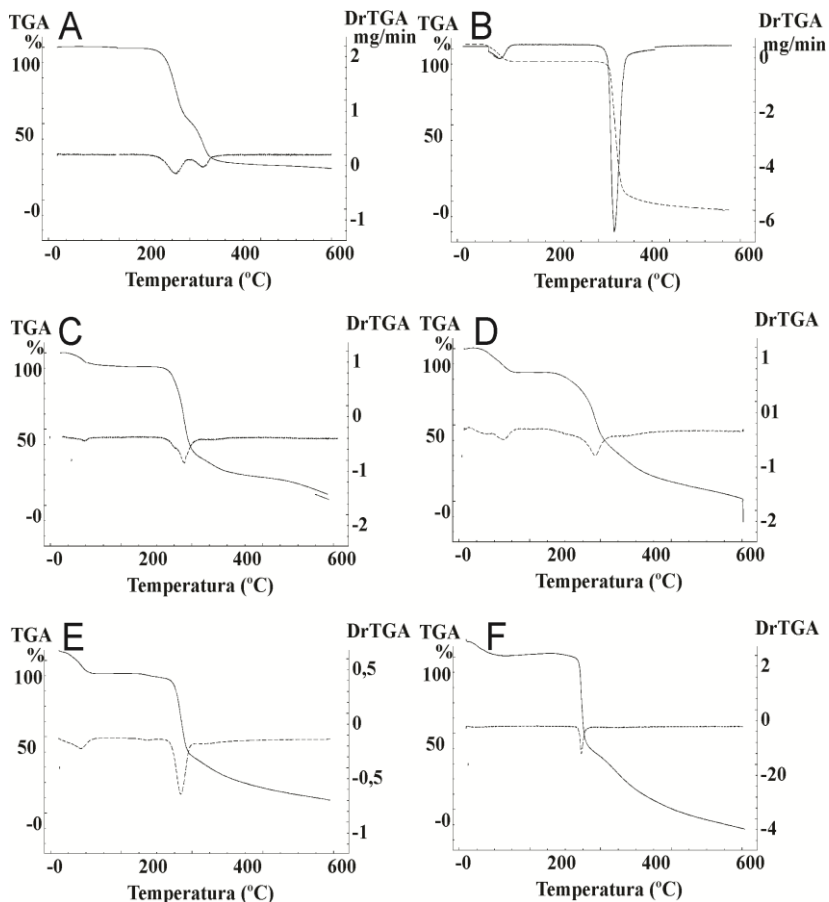


Figura 7. Curvas TG obtidas para o NFX (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D), malaxagem seguida de liofilização (E) e malaxagem seguida de *spray-drying* (F).

### 3.3.2 Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros obtidos para as amostras estão representados na Figura 8. No espectro 8A, bandas características do NFX exibem bandas de vibração em cerca de  $1716\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $-\text{COOH}$ ) e em  $1631\text{ cm}^{-1}$  (grupamento ceto-piridina). O espectro da  $\beta$ CD (8B) mostra picos proeminentes em  $3398\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2925\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1643\text{ cm}^{-1}$  (estiramento H-O-H),  $1157\text{ cm}^{-1}$  (C-O), e  $1028\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C). O espectro da mistura física (8C) corresponde a superposição dos dois componentes individuais, com uma diminuição na intensidade dos picos. O espectro infravermelho obtido para as amostras

obtidas por coevaporação (8D), malaxagem seguida de liofilização (8E) ou *spray-drying* (8F) demonstram entretanto, uma forte redução ou ainda a completa desapareição da banda característica do NFX em  $1716\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $-\text{COOH}$ ), indicando que o grupamento funcional carboxílico da molécula hóspede está dentro da cavidade hidrofóbica da molécula hospedeira. Os diferentes métodos de preparação geraram diferentes graus de interação e/ou amorfização, o que afeta a intensidade dos picos (Figuras 8D-F). Este fato deve-se a força de interação entre fármaco-CD, sugerindo a formação de um complexo de inclusão no estado sólido, confirmando os resultados previamente obtidos pela análise térmica e estudos de solubilidade de fase.

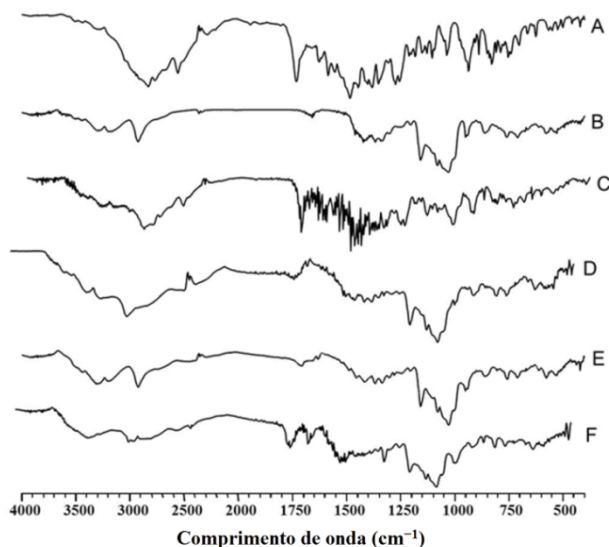


Figura 8. Espectros infravermelho obtidos para NFX (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporação (D), malaxagem seguida da liofilização (E) malaxagem seguida do *spray-drying* (F).

### 3.3.3 Estudos de difração de raios-X de pó (DRXP)

A análise de DRXP permite não só detectar a formação de complexo como também conhecer sua estrutura e as interações que se estabelecem entre a molécula hóspede e a CD (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). Estudos de DRXP foram realizados para obter maiores evidências da formação de complexos de inclusão de NFX/ $\beta$ CD e suas características cristalinas, representados na figura 9. O padrão de DRXP para o NFX (Figura 9A) revela uma séria de picos intensos em 7,86; 9,90; 10,70; 11,99; 14,92;

16,09; 18,76; 20,68; 22,76; e 25,02 devido à sua natureza cristalina. Este estudo juntamente com a análise térmica e o espectro de infravermelho indicam que o NFX utilizado neste trabalho é a forma A, descrita por Barbas e colaboradores (BARBAS et al., 2006).

A  $\beta$ CD (9B) exibe picos cristalinos característicos em 10,52; 12,39; 15,19; 16,91; 18,64; 20,77 e 22,56. No caso da mistura física (9C) alguns picos cristalinos da  $\beta$ CD e NFX são notados. Entretanto, o espectro obtido para o complexo por coevaporação (9D) preserva alguns picos cristalinos da  $\beta$ CD mas não os picos característicos do NFX, sugerindo a formação de um novo cristal com um padrão de difração diferente da mistura física. Esta formação pode explicar temperaturas diferentes encontradas na análise por DSC quando comparada aos outros complexos, em que este novo cristal de complexo apresenta uma energia diferente dos outros complexos que são mais amorfizados devido às diferenças nos processos de obtenção.

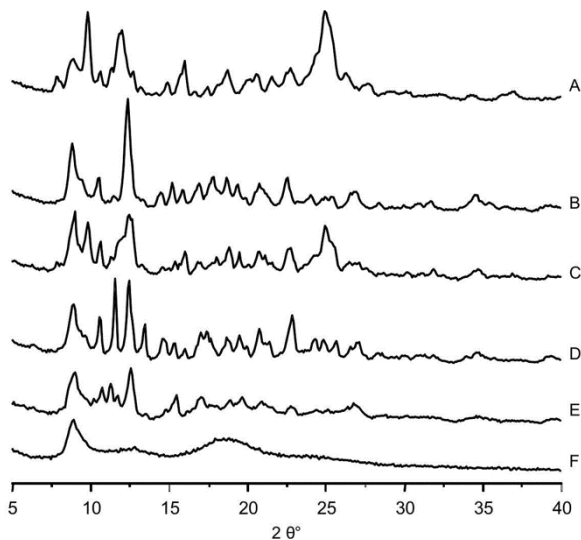


Figura 9. Difratomogramas obtidos para o NFX (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C) e das amostras secas por: coevaporação (D), malaxagem seguida da liofilização (E) e malaxagem seguida do *spray-drying* (F).

Quando comparado ao padrão de difração observado na mistura física, os complexos de inclusão (9E-F) mostram diminuição na intensidade dos picos, indicando uma redução na cristalinidade. Para o complexo de inclusão seco em liofilizador (9E) a cristalinidade do NFX foi bastante reduzida, tanto pela formação de um complexo como pelo próprio processo de secagem



(liofilização). No caso dos complexos secos em *spray-dryer* (9F), uma completa desapareção dos picos intensos do NFX foi evidenciada, o que demonstra uma estrutura amorfa que vai influenciar, posteriormente, na solubilidade.

### 3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias obtidas para o NFX,  $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão estão demonstrados na figura 10.

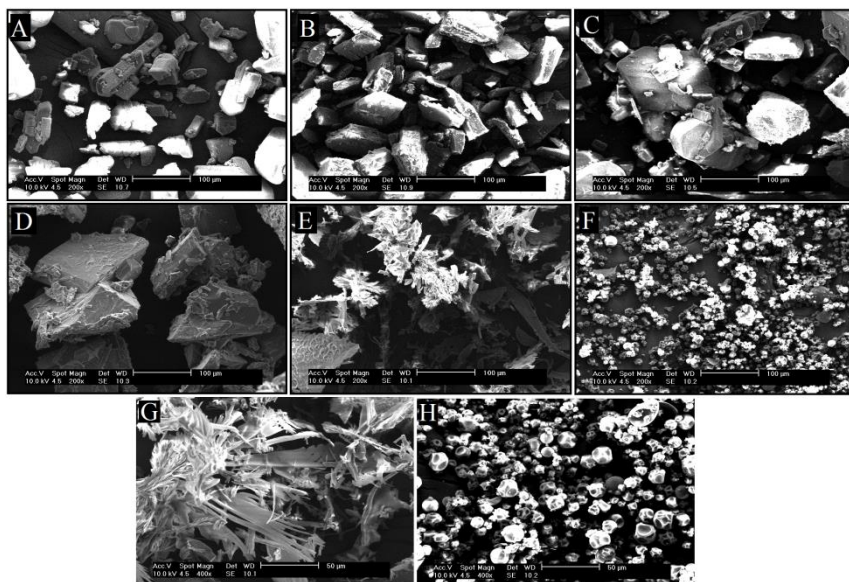


Figura 10. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para o NFX (A),  $\beta$ CD (B), mistura física (C), coevaporado (D) malaxagem seguida da liofilização (E) e malaxagem seguida do *spray-drying* (F), ordem de magnificação de 200x, malaxagem seguida da liofilização (E) e malaxagem seguida do *spray-drying* (F), ordem de magnificação de 400x.

Cristais em bloco podem ser observados para o NFX (Figura 10A) e para  $\beta$ CD observam-se cristais poliédricos largos (Figura 10B). No caso da mistura física (10C) cristais de fármaco e de  $\beta$ CD são facilmente visualizados, revelando algumas similaridades com as moléculas livres. Enquanto que para o produto coevaporado (10D) forma um cristal diferente, o que confirma a formação de um complexo de inclusão com um novo evento de fusão detectado na análise por DSC e ainda o diferente padrão de difração obtido na DRXP. Os complexos obtidos por liofilização formaram cristais em formato

de agulha (10E) e os obtidos por *spray-drying* (10F) mostraram uma característica amorfa, uma vez que não é possível distinguir entre os dois componentes.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NOS COMPLEXOS OBTIDOS

A quantificação foi baseada no fato de que a  $\beta$ CD e seus complexos são insolúveis em n-hexano, mas o NFX livre é solúvel. O termo “NFX livre” foi utilizado para se referir ao NFX na forma não complexada. Para maximizar a solubilidade do NFX em n-hexano, 2% de ácido acético foi utilizado.

Com o objetivo de determinar a quantidade de NFX livre e de NFX incluído na cavidade da  $\beta$ CD, o método de “lavagem com n-hexano” foi utilizado. Uma adaptação do método foi necessária para garantir a solubilidade do NFX na forma livre em n-hexano. Este ajuste foi feito pela mistura de ácido acético em n-hexano (98:2 v/v). A solubilidade do NFX livre foi determinada em n-hexano e em n-hexano/ácido acético (98:2 v/v) e encontrou-se cerca de 70  $\mu\text{g/mL}$  e 230  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este resultado demonstrou que 2% de ácido acético foram suficientes para aumentar a solubilidade do NFX na forma livre a um nível necessário, uma vez que a máxima quantidade de NFX que pode ser encontrada em 5 mg de complexo de inclusão é de 1,1mg (NFX: $\beta$ CD, 1:1, M/M). Igualmente, a solubilidade dos complexos de inclusão e da  $\beta$ CD foram avaliadas em n-hexano/ácido acético. Este teste evidenciou que o ácido acético não interferiu no método, ou seja,  $\beta$ CD e seus complexos permanecem insolúveis em n-hexano/ácido acético (98:2 v/v).

A quantificação do fármaco foi determinada por CLAE conforme método validado (Apêndice A) e seus resultados em porcentagem estão demonstrados na tabela 1. Pode-se observar que quantidades significativas de NFX foram incorporadas a CD, com a maior eficiência de complexação sendo obtida para o produto coevaporado e malaxada e seca em *spray-drying*, e uma eficiência média para as amostras malaxadas e secas em liofilizador.

### 3.5 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS SÓLIDOS

A solubilidade do NFX foi investigada em água e sob condições de pH e temperatura fisiológicas geralmente encontradas no duodeno (pH 6,8 a 37 °C), onde o fármaco exibe melhor absorção. Tabela 1 mostra os valores de solubilidade estimados para cada solução estudada. Uma melhora na solubilidade pode ser observada quando o fármaco está na sua forma complexada. Entretanto, os complexos obtidos por coevaporação, apesar da

alta eficiência de complexação, mostrou o menor grau de solubilidade dentre os complexos obtidos. Este fato deve-se provavelmente as características desta nova forma cristalina formada, como se pode observar na MEV e confirma-se com a DRXP. Esta estrutura cristalina resultou em uma baixa solubilidade.

Tabela 1. Quantificação do NFX e caracterização física, química e microbiológica estão descritas abaixo para mistura física (MF) e complexos obtidos por coevaporação (COE), malaxagem seguida de liofilização (MLF) e malaxagem seguida de *spray-drying* (MSD).

	Quantidade de NFX	Solubilidade em água (25 °C)	Solubilidade em fluido intestinal simulado pH 6,8 (37 °C)	Diâmetro da zona de inibição ± DP <sup>a</sup>	Potência antimicrobiana <sup>b</sup>
	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	(mm)	(%)
NFX	100 ± 0,9	160,6 ± 0,08	58,94 ± 0,02	20,92 ± 0,62 <sup>b</sup>	100,0
MF	50 ± 0,7	159,8 ± 0,02	59,01 ± 0,04	20,73 ± 1,06 <sup>b</sup>	99,7
COE	97 ± 0,8	141,84 ± 0,02	62,86 ± 0,04	18,08 ± 4,31 <sup>b</sup>	83,2
MLF	73 ± 3,2	378,74 ± 0,03	137,95 ± 0,07	23,02 ± 1,64 <sup>b</sup>	123,3
MSD	90 ± 3,7	350,92 ± 0,04	97,56 ± 0,02	21,65 ± 0,86 <sup>b</sup>	110,4

<sup>a</sup> diâmetro da zona de inibição (mm) a 40 µg/mL, média de 12 placas.

<sup>b</sup> crescimento da zona de inibição é proporcional ao log da concentração

Por outro lado, ao se comparar com a solubilidade do NFX na sua forma não complexada, um aumento cerca de 2,4 vezes foi verificado para os complexos obtidos por malaxagem seguida de liofilização, que a solubilidade aquosa do fármaco foi cerca de 160 µg/mL. NFX mostrou uma relação proporcional entre os valores de solubilidade obtidos para o fármaco e os complexos em diferentes valores de pH estudados. A solubilidade em água foi maior que a encontrada no fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8). Este resultado pode ser explicado pelo pH da água ultrapura utilizada neste

experimento, de 5,5. Pela figura da distribuição das espécies (Figura 2), nota-se que em pH 5,5 o NFX existe em maior quantidade na forma B (80%) do que na forma C (20%), o contrário do que ocorre em pH 6,8 (16% na forma B e 83% na forma A). A forma B apresenta todos os grupos ionizados, sendo a forma ionizada a de maior solubilidade em água, por isso o fármaco exibe mais solubilidade em água que em fluido intestinal simulado.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO

As velocidades de dissolução do fármaco nos complexos sólidos  $\beta$ CD:NFX foram comparados com o NFX livre em pó e estão exibidos na figura 11. Em geral, as taxas de dissolução obtidas para as formulações de complexo entre  $\beta$ CD:NFX (Figuras 11C-E) foram maiores quando comparadas tanto com o fármaco livre (13A) como quanto a mistura física (11B). Portanto, a presença de  $\beta$ CD simplesmente não afeta o perfil de dissolução, mas sim a formação verdadeira de um complexo de inclusão. Nos complexos obtidos, a  $\beta$ CD diminui a tensão interfacial entre as partículas sólidas de NFX e o meio de dissolução, melhorando a molhabilidade e as velocidades de dissolução.

Os complexos preparados pela técnica de coevaporação (11C) revelaram um aumento nas propriedades de dissolução do fármaco, com uma taxa de dissolução maior que 50% NFX em 30 min, enquanto que o NFX sozinho (11A) exibiu uma taxa de dissolução de 40% em 10 min e não mais que 50% em 60 min. De acordo com a caracterização do complexo, o produto coevaporado mostrou a formação de um complexo de inclusão, apesar da dissolução apresentada ter sido menos que a observada para os outros produtos (11D e 11E). Este fato deve ser ocasionado provavelmente devido à formação de uma nova estrutura altamente cristalina, como observada nas análises de MEV e na DRXP, com partículas de tamanho maior, o que resulta em uma menor superfície de contato com o meio de dissolução. O complexo obtido por malaxagem seguida de *spray-drying* também forneceu um melhor perfil de dissolução (11D) quando comparado a molécula de NFX, com cerca de 62% sendo dissolvida no complexo de inclusão em 20 min. Estes resultados confirmam os encontrados para as análises de DSC, DRXP e MEV para estes complexos de inclusão.

Após 10 minutos, o complexo preparado aplicando-se o processo de malaxagem e liofilização mostrou o melhor perfil de dissolução para o NFX. Em específico, o complexo liofilizado apresentou cerca de 85% de NFX dissolvido em apenas 10 minutos, em resultado tanto do seu grau de amorfização atribuído ao processo de obtenção como a complexação do fármaco na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ CD. Este novo complexo de inclusão

aumentou a molhabilidade, promovendo um complexo mais solúvel que o fármaco sozinho e, conseqüentemente, um melhor perfil de dissolução.

Com o objetivo de analisar a equivalência dos dados de dissolução, um modelo independente baseado no cálculo de fator de diferença ( $f_1$ ) e similaridade ( $f_2$ ) foi utilizado (MOORE; FLANNER, 1996). Para perfis diferentes, valores superiores a 15% ( $f_1$ ) devem ser encontrados e para curvas similares, os valores de  $f_2$  devem estar compreendidos entre 50 e 100 (MOORE; FLANNER, 1996; SHAH, V. P. et al., 1998). Os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 2.

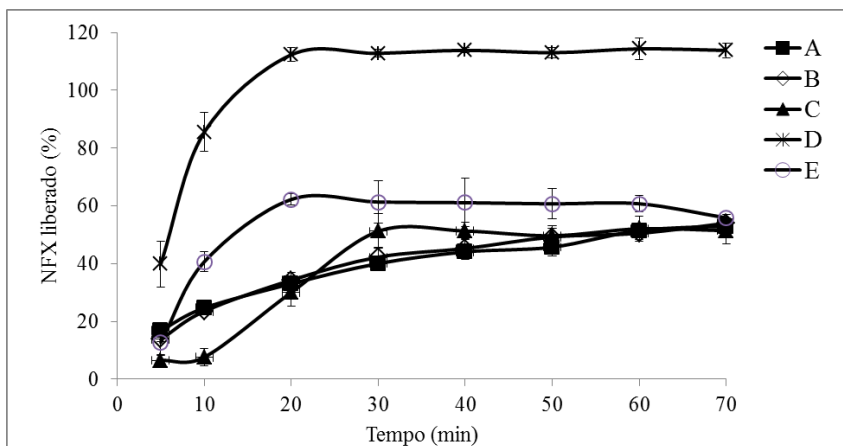


Figura 11. Perfil de dissolução obtido para o NFX (A), mistura física (B), coevaporado (C) malaxagem seguida da liofilização (D) e malaxagem seguida do *spray-drying* (E).

Tabela 2. Resultado dos valores obtidos nas comparações dos perfis de dissolução dos perfis de diferença ( $f_1$ ) e similaridade ( $f_2$ ) bem como a eficiência de dissolução.

Comparação	$f_1$	$f_2$
NFX x MF	4,26	83,39
NFX x COE	21,87	47,07
NFX x MS	25,77	42,28

O valor obtido para a mistura física indica a similaridade com a curva do NFX puro, ou seja, a simples presença da  $\beta$ CD não influencia na solubilidade do NFX, como já foi constatado anteriormente nos estudos de solubilidade de fase. Por outro lado, os valores obtidos para os complexos de inclusão preparados por coevaporação e *spray-dryer* revelaram que as

curvas não são similares à obtida para o NFX puro, sugerindo a melhora nas propriedades de dissolução. O produto obtido por malaxagem seguido de liofilização não pôde ser analisado por  $f_1$  e  $f_2$  devido a sua alta porcentagem de fármaco dissolvido em pouco tempo, tornando-se desnecessária, portanto, uma correlação.

### 3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados para a atividade antimicrobiana *in vitro* do NFX e seus complexos de inclusão, medidos pela média do crescimento da zona de inibição, estão descritos na tabela 1, e uma placa para ilustração do método pode ser visualizada na Figura 12.

A mistura física apresentou praticamente a mesma atividade que o NFX puro. O complexo coevaporado, entretanto, demonstrou a pior potência antimicrobiana comparada ao fármaco puro (83,2%). Melhora na atividade antimicrobiana pôde ser observada para os complexos malaxados seguidos de liofilização ou *spray-drying* (aumento de 10,4% e 23,3% em comparação com o NFX, respectivamente), sendo a atividade antimicrobiana do complexo malaxado e liofilizado significativamente superior ( $p = 0,0015$ ). Estes resultados podem ser relacionados com o maior grau de solubilização do NFX observada nos complexos de inclusão obtidos por malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*. Pode-se concluir que a formação do complexo e o estado amorfo promoveram uma difusão maior do NFX no ágar até a célula bacteriana.

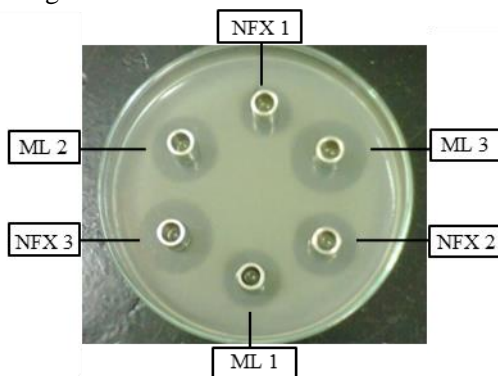


Figura 12. Foto representativa de uma placa do teste de difusão em ágar com delineamento 3x3 para comparação dos halos do NFX e complexo obtido por malaxagem seguida de liofilização (ML). Os números correspondem às três concentrações utilizadas (1-baixa: 10 $\mu$ g/mL, 2-média: 20  $\mu$ g/mL e 3- alta: 40  $\mu$ g/mL).

### 3.8 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

O método de formação do complexo de inclusão com melhores resultados de perfil de dissolução e atividade antimicrobiana foi a malaxagem seguida da liofilização. Este complexo NFX/ $\beta$ CD foi eleito para realização do estudo por RMN, para confirmar sua formação e caracterizar o modo de ligação entre a CD e o fármaco.

A formação dos complexos de inclusão pôde ser evidenciada pelas alterações nos deslocamentos químicos dos sinais de  $^1\text{H}$  do fármaco, quando incluído na cavidade lipofílica da  $\beta$ CD, em comparação com os sinais de fármaco sem a presença da  $\beta$ CD, nas mesmas condições (ASBAHR et al., 2009; GREBOGI et al., 2012). Portanto, a primeira estratégia foi adquirir espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para o NFX e para o complexo NFX/ $\beta$ CD em  $\text{D}_2\text{O}$ . Entretanto, apenas o complexo NFX/ $\beta$ CD foi solúvel em  $\text{D}_2\text{O}$ . O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo mostrou a presença dos sinais do NFX, evidenciando a formação de um complexo de inclusão entre o NFX e a  $\beta$ CD. Além disso, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  demonstrou uma relação de áreas de 7:1 entre os sinais da  $\beta$ CD e os sinais da NFX, confirmando a estequiometria 1:1 observada nos estudos de solubilidade de fases. A formação do complexo de inclusão NFX/ $\beta$ CD foi suportada pelos experimentos de RMN de efeito nuclear Overhauser (ROESY 1D). Os experimentos RMN ROESY 1D obtidos pela excitação seletiva dos hidrogênios H-3 e H-5 da  $\beta$ CD em 3,84 e 3,74 ppm causaram uma intensificação dos sinais, pelo efeito Overhauser nuclear (NOE), em 8,60; 7,64; 4,37 e 1,42 ppm da NFX (Figura 13). Além disso, foi observada a intensificação dos sinais do NFX quando apenas a frequência de ressonância dos hidrogênios H-3 em 3,84 ppm foi seletivamente excitada (Figura 13).

A excitação seletiva dos H-5, em 3,74 ppm, causou maior intensificação do sinal do NFX a 8,60 ppm, indicando que este hidrogênio do NFX está mais próximo ao H-5 da  $\beta$ CD que os demais hidrogênios da  $\beta$ CD. Estes resultados revelaram que o complexo de inclusão NFX/ $\beta$ CD foi formado, com a estrutura do NFX parcialmente inserida na cavidade da  $\beta$ CD, conforme representado na Figura 14.

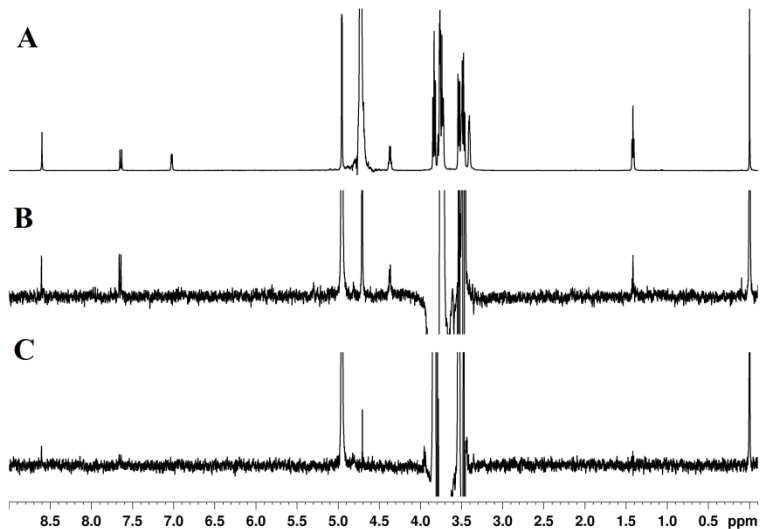


Figura 13. Espectro de RMN  $H^1$  do complexo NFX/ $\beta$ CD (A), espectro 1D ROESY do complexo NFX/ $\beta$ CD obtido por irradiação seletiva em 3,84 ppm (B) e 3,74 ppm (C) sinais correspondentes ao  $\beta$ CD H-3 e H-5, respectivamente.

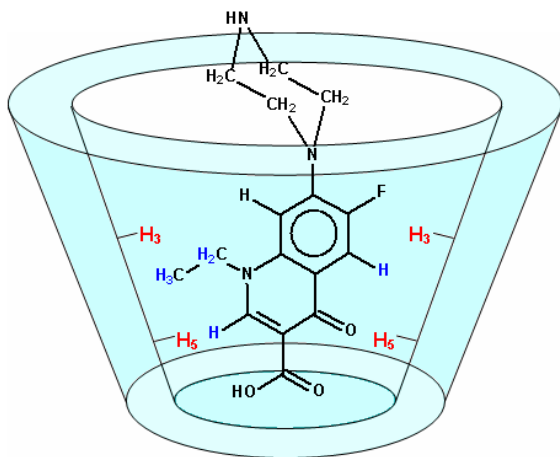


Figura 14. Representação esquemática do complexo de inclusão NFX/ $\beta$ CD, demonstrando a estrutura do NFX parcialmente inserida na cavidade da  $\beta$ CD.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preparação de complexos de inclusão com ciclodextrinas objetivam a melhora na absorção do fármaco e foi avaliada para tratar o problema de baixa solubilidade de fármacos classe BCS IV, como o norfloxacino. Em geral, os resultados deste estudo sustentam a possibilidade de obtenção de complexos de inclusão NFX e  $\beta$ CD (1:1 M/M). Esta CD foi selecionada devido aos seus bons resultados nos estudos de diagrama de fase e fluorescência, o que viabiliza ainda mais a pesquisa, pois é a CD de menor custo. As interações entre o fármaco e a CD foram bem caracterizadas por todas as técnicas físico-químicas empregadas para verificação da formação de complexos de inclusão. Estes complexos foram obtidos por diferentes métodos que melhoraram a taxa de dissolução do fármaco. Os complexos obtidos por malaxagem seguida de liofilização forneceram ao NFX hóspede características desejáveis do aspecto físico-químico e atividade antimicrobiana. Além do mais, a técnica de liofilização consiste em uma técnica de fácil aplicação e potente para obtenção de formulações no estado sólido, podendo ser transposta para escala industrial. A formação destes complexos foi ainda confirmada por RMN e pode-se obter a forma com que o fármaco está inserido na cavidade da  $\beta$ CD. Os complexos de NFX: $\beta$ CD podem, portanto, maximizar e facilitar a absorção oral, reduzindo assim a dose necessária devido a sua maior atividade antimicrobiana, o que poderá aumentar os efeitos benéficos do NFX além de fornecer um material eficiente para o futuro desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.



---

---

## DISCUSSÃO GERAL

---

---



A via oral representa a escolha para administração de formas farmacêuticas por apresentar facilidade e conveniência para o paciente, além do baixo custo. Entretanto, muitos fármacos com atividade e efeitos colaterais reconhecidos têm apresentado falhas terapêuticas quando administrados oralmente. Estas falhas possuem diversos precedentes, dos quais podem ser destacados problemas de estabilidade e biodisponibilidade.

Formulações farmacêuticas na forma de suspensões normalmente são destinadas a pacientes pediátricos que apresentam dificuldade em ingerir formas orais sólidas como cápsulas e comprimidos. Quando suspensões pediátricas são prescritas em âmbito hospitalar e não se encontram disponíveis comercialmente, geralmente comprimidos são triturados ou cápsulas são abertas, o que pode comprometer a administração correta da dose e a eficiência do tratamento.

A maioria dos anti-hipertensivos está disponível comercialmente apenas como comprimidos para uso adulto, criando assim a necessidade de formulações para uso pediátrico. Geralmente, formas farmacêuticas líquidas extemporâneas são facilmente preparadas com a utilização de matéria-prima e excipientes adequados. Entretanto, um problema grave que permanece é a ausência de informações acerca da adequabilidade e estabilidade destas formulações.

O capítulo 2 apresenta a realidade do HU da UFSC de produção de suspensões pediátricas contendo anti-hipertensivos. Estas suspensões, não são controladas rotineiramente para verificação da estabilidade. O presente estudo busca aproximar a academia do ambiente prático hospitalar a fim de prestar apoio científico para a comunidade. Para tanto, a estabilidade físico-química e microbiológica foi verificada pelas técnicas usuais e recomendadas de avaliação. Usualmente, estudos com suspensões pediátricas relatam apenas dados de estabilidade química. Quando a estabilidade física e microbiológica também são verificadas, a qualidade das suspensões pode ser melhor assegurada.

As suspensões foram preparadas conforme protocolo do HU/UFSC e o doseamento dos fármacos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência por métodos previamente validados. A caracterização físico-química foi determinada por meio de parâmetros como volume de sedimentação, redispersibilidade, tamanho de partícula, pH e potencial zeta e o controle microbiológico foi realizado pelo método de contagem de micro-organismos viáveis totais e pesquisa de patógenos específicos. Os resultados do doseamento revelaram que as suspensões de SPR e de FRS podem ser armazenadas e administradas por até sete dias sem comprometimento da estabilidade e da terapêutica. No caso da HCTZ houve acentuada degradação, o que pode ser explicado devido a sua

suscetibilidade em sofrer reações de hidrólise em função do pH do meio, sendo sua degradação completa em meio muito alcalino.

Pôde-se notar a utilização de uma forma farmacêutica líquida com problemas de instabilidade da HCTZ. A formulação foi otimizada com sucesso por meio do ajuste com ácido cítrico para pH com melhor estabilidade (3,3), segundo a literatura. Esforços foram direcionados com o intuito de propor uma otimização da formulação possível de ser realizada em âmbito hospitalar e que tornasse a suspensão pediátrica segura e eficaz.

A HCTZ é um anti-hipertensivo amplamente utilizado da classe dos diuréticos tiazídicos tanto para pacientes pediátricos como adultos. A prescrição deste fármaco objetiva o tratamento de hipertensão arterial e edema associado à insuficiência cardíaca congestiva. O problema de instabilidade verificado para o fármaco não é o único desafio de utilização da HCTZ via oral, uma vez que segundo Amidon e colaboradores, classifica-se como um fármaco classe IV.

O comportamento *in vivo* de fármacos oralmente administrados depende das características de solubilidade e permeabilidade. Compostos farmacêuticos pertencentes à classe IV apresentam a sua absorção limitada não só pela baixa dissolução aquosa no ambiente gastrointestinal, mas também pela sua capacidade de permeação limitada, de modo que poucos níveis de fármaco dissolvido levarão a uma baixa biodisponibilidade. Um dos desafios apresentados no desenvolvimento de formulações contendo fármacos classe IV situa-se na dificuldade de desenvolver sistemas de liberação capazes de aperfeiçoar ambas as propriedades em deficiência. Alguns avanços tecnológicos podem ser propostos neste sentido, como a complexação dos fármacos com as CDs.

A utilização da CD como tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de complexos de inclusão contendo HCTZ foi a proposta do capítulo 3 e objetivou a melhora das características biofarmacêuticas do fármaco. Diferentes CDs e em diferentes pHs que mantinham a estabilidade do fármaco foram avaliados e atingiu-se o melhor resultado com a  $\beta$ CD em pH 3,3 na proporção molar 1:1. Para obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido, diferentes técnicas foram empregadas, como a coevaporação, a malaxagem, a liofilização e o *spray-drying*. Todos os complexos sólidos obtidos foram caracterizados para comprovação da inclusão do fármaco e sugeriu-se a forma com que a HCTZ está alojada na cavidade da  $\beta$ CD. A apresentação do completo estudo físico-químico realizado por meio das técnicas analíticas mais empregadas nesta área foi fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Das metodologias de obtenção, destaca-se a malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*. Ambas as técnicas de secagem envolvem

geração rápida e eficiente de partículas sólidas em uma única etapa de processo contínuo, adaptável a controle automático e passível de transposição para escala industrial. Entre estas técnicas, a malaxagem seguida de liofilização forneceu o produto sólido com melhores características de solubilidade e perfil de dissolução. Este complexo apresentou sua completa dissolução em fluido intestinal simulado em um tempo muito curto, parâmetro fundamental que irá refletir diretamente na absorção do fármaco.

A característica de permeabilidade também foi averiguada por meio de um estudo *in vitro* simples, intermediário para teste da formulação, evitando-se assim a realização direta de um estudo *in vivo*, prática que acarreta na utilização de mais animais além de ser economicamente mais dispendiosa. O experimento de cultura de células revelou uma quantidade maior de fármaco permeada do complexo de inclusão malaxado seguido de liofilização quando comparado ao fármaco isolado ou em sua mistura física. Esta metodologia revelou ainda uma proteção do fármaco frente à hidrólise em condições básicas.

Dadas estas premissas, foi possível obter um complexo de inclusão com a HCTZ que atende ao objetivo proposto de melhora da solubilidade, permeabilidade e estabilidade do fármaco. Este estudo é um indicativo de que estes complexos poderão apresentar características de biodisponibilidade mais adequadas se veiculados em alguma formulação farmacêutica.

Com o mesmo intuito, o NFX, fármaco classe biofarmacêutica IV, foi utilizado para o desenvolvimento de complexos de inclusão com as CDs no capítulo 4. Nesta oportunidade, por se tratar de um fármaco antimicrobiano, não só as características biofarmacêuticas foram focadas como a ação microbiológica do fármaco visando o contexto de resistência bacteriana como problema de saúde pública atual.

A obtenção de complexos de inclusão com o NFX foi possível em pH 3 na presença da  $\beta$ CD, em proporção molar 1:1. Da mesma forma que para a HCTZ, os complexos sólidos foram obtidos por diferentes técnicas e uma completa caracterização físico-química e morfológica foi demonstrada. O estudo de RMN foi capaz de determinar a forma com que o fármaco está incluído na cavidade da  $\beta$ CD.

A técnica de obtenção do complexo de inclusão sólido de NFX:  $\beta$ CD foi a malaxagem seguida de liofilização, a mesma encontrada para os complexos com HCTZ. Não coincidentemente que ambos os fármacos apresentaram melhores resultados com a malaxagem, pois ambos possuem estruturas orgânicas com peso molecular aproximado e característica de baixa solubilidade. A malaxagem é um método aplicado para a

complexação de substâncias muito pouco solúveis em água, demonstrando neste estudo a sua efetividade.

Igualmente, a  $\beta$ CD possui uma cavidade relativamente hidrofóbica, capaz de englobar substâncias mais apolares, como os fármacos em estudo, além de possuir um diâmetro interno da cavidade compatível com as dimensões destes fármacos. A  $\beta$ CD é a CD mais comercialmente atrativa por sua simplicidade de síntese, preço e, conseqüentemente, disponibilidade.

O complexo de inclusão de NFX produzido por malaxagem seguida de liofilização ou de *spray-drying* demonstrou uma liberação de 100% do fármaco em poucos minutos quando em fluido intestinal simulado e, ainda, uma maior potência antimicrobiana *in vitro*. Estes resultados revelam o potencial deste agente antimicrobiano quando na forma de complexo de inclusão provendo um eficiente material para o futuro desenvolvimento de formulações com aumento dos benefícios terapêuticos do NFX.

A despeito do grande progresso científico, tecnológico e de inovação decorrente do avanço das ciências farmacêuticas e médicas, o desenvolvimento de sistemas ainda apresenta várias dificuldades em termos de estratégia terapêutica e de obtenção de novas formulações. Desta forma, é imperativa a busca constante de novas alternativas terapêuticas que possam modificar este panorama adverso. Dentro deste contexto, foi possível observar que mesmo os princípios ativos amplamente reconhecidos podem explorar os efeitos benéficos dos carreadores chamados de CDs. A presente dissertação fornece um completo estudo contendo o desenvolvimento, produção e caracterização de complexos de inclusão com dois importantes fármacos classe IV, HCTZ e NFX, visando o aumento da eficácia terapêutica que possibilite a adesão do paciente ao tratamento por meio da utilização desta alternativa tecnológica e fármaco-econômica.



## CONCLUSÕES

- As suspensões pediátricas de furosemida e espironolactona demonstraram sua estabilidade físico-química e microbiológica durante o período de 7 dias;
- A suspensão de hidroclorotiazida sem controle de pH apresentou baixa estabilidade química com hidrólise do fármaco;
- Uma otimização da suspensão de hidroclorotiazida por meio de um ajuste simples de pH, passível de ser realizado em nível hospitalar, preservou a estabilidade da formulação;
- O desenvolvimento de complexos de inclusão contendo a hidroclorotiazida ou o norfloxacino utilizou a  $\beta$ -ciclodextrina em proporção molar 1:1;
- Todas as técnicas de preparação dos complexos de inclusão entre os fármacos e as ciclodextrinas manifestaram melhora nas características quando comparados à substância isolada ou na mistura física;
- As técnicas que exibiram complexos com as melhores características foram a malaxagem seguida de liofilização ou *spray-drying*, com destaque para a primeira;
- A completa caracterização físico-química e morfológica comprovou a formação de complexos de inclusão verdadeiros;
- O estudo por meio das técnicas espectroscópicas sugeriu a forma com que os fármacos estão inseridos na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -ciclodextrina;
- O estudo de dissolução confirmou a melhora acentuada na liberação do fármaco dos complexos de inclusão em fluido intestinal simulado;
- O complexo de inclusão entre hidroclorotiazida e  $\beta$ -ciclodextrina demonstrou ainda uma maior quantidade de fármaco permeado em estudo de permeabilidade por cultura de células bem como a proteção do fármaco frente à hidrólise em condições básicas;
- O complexo de inclusão entre norfloxacino e  $\beta$ -ciclodextrina evidenciou um aumento da potência antibacteriana em estudo da atividade microbiológica *in vitro*;
- Os métodos desenvolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência apresentaram-se específicos, exatos, precisos e robustos para quantificação tanto da hidroclorotiazida como do norfloxacino nos complexos de inclusão desenvolvidos.



## REFERÊNCIAS

AALTONEN, J.; ALLESO, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K. C.; RANTANEN, J. Solid form screening—a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.

ABUO-RAHMA, G. E. D. A. A.; SARHAN, H. A.; GAD, G. F. M. Design, synthesis, antibacterial activity and physicochemical parameters of novel N-4-piperazinyl derivatives of norfloxacin. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 11, p. 3879-3886, 2009.

AGÜEROS, M.; RUIZ-GATÓN, L.; VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K.; ESPUELAS, S.; PONCHEL, G.; IRACHE, J. Combined hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and poly (anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 405-413, 2009.

AHUJA, N.; KATARE, O. P.; SINGH, B. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 1, p. 26-38, 2007.

AL-RASHOOD, K. A.; AL-KHAMIS, K. I.; EL-SAYED, Y. M.; AL-BELLA, S.; AL-YAMANI, M. A.; ALAM, S. M.; DHAM, R. Bioequivalence evaluation of norfloxacin 400 mg tablets (Uroxin and Noroxin) in healthy human volunteers. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 21, p. 175-179, 2000.

ALEEM, O.; KUCHEKAR, B.; PORE, Y.; LATE, S. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 3, p. 535-540, 2008.

ALNAJJAR, A.; IDRIS, A. M.; ABUSEADA, H. H. Development of a stability-indicating capillary electrophoresis method for norfloxacin and its inactive decarboxylated degradant. **Microchemical Journal**, v. 87, n. 1, p. 35-40, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDERSSON, M. I.; MACGOWAN, A. P. Development of the quinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 1-11, 2003.

ANGEL, M. J. R.; AGUSTI, M. T. G.; ROMERO, J. S. E.; BROCH, S. C. Photodegradation and photostability studies of bendroflumethiazide (BFMT) in pharmaceutical formulations and urine samples by micellar liquid chromatography. **L.C. G.C. Europe**, v. 18, p. 32-40, 2005.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, v.6, p.427-430, 2010.

ARNDT, C.; CRUZ, M. C.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 145, p. 1989-2000, 1999.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2012.

ASBAHR, A. C. C.; FRANCO, L.; BARISON, A.; SILVA, C. W.; FERRAZ, H. G.; RODRIGUES, L. N. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP $\beta$ CD and polymers: Preparation and characterization. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 7, p. 2718-2723, 2009.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M.; BROWNELL, C. pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 1, p. 85-89, 2000.

BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKACS-NOVAK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 335-41, 2008.

BARBAS, R.; MARTÍ, F.; PROHENS, R.; PUIGJANER, C. Polymorphism of norfloxacin: Evidence of the enantiotropic relationship between polymorphs A and B. **Crystal growth & design**, v. 6, n. 6, p. 1463-1467, 2006.

BASAVAIHAH, K.; CHANDRASHEKAR, U. Sensitive micro analysis of frusemide (furosemide) in bulk drug and formulations by visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). **Indian Journal of Chemical Technology** v. 12, p. 405-406, 2005.

BELLRINGER, M.; SMITH, T.; READ, R.; GOPINATH, C.; OLIVIER, P.  $\beta$ -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 367-376, 1995.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 1027, 2009.

BOSCH, M. E.; SANCHEZ, A. J.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 1, p. 9-17, 2008.

BRASIL. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília, Diário Oficial da União 29 mai. 2003.

BRASIL. **Resolução RDC n. 20, de 5 de maio de 2011**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília, Diário Oficial da União 09 mai. 2011.

BREDA, S. A.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. F.; MANZO, R. H.; OLIVERA, M. E. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1, p. 106-113, 2009.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Professional, 2010.

BUCKLEY, S. T.; FISCHER, S. M.; FRICKER, G.; BRANDL, M. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 235-250, 2012.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 78-99, 2007.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329-E357, 2005.

CHENG, G.; HAO, H.; DAI, M.; LIU, Z.; YUAN, Z. Antibacterial Action of Quinolones: From Target to Network. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2013.

CHOCKALINGAM, A.; CAMPBELL, N. R.; FODOR, G. J. Worldwide epidemic of hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 22, n. 7, p. 553-555, 2006.

CONROY, S. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. **Acta Paediatrica**, v. 92, n. 4, p. 408-10, 2003.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in polymer science**, v. 30, n. 1, p. 38-70, 2005.

CUDINA, O.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; RUVARAC-BUGARCIC, I.; JANKOVIC, I. Interaction of hydrochlorothiazide with cationic surfactant micelles of cetyltrimethylammonium bromide. **Colloid Surface Physicochemical Engineering Aspects**, v. 256, p. 225-232, 2005.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; HOFFMAN, A.; AMIDON, G. E.; AMIDON, G. L. The solubility–permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 6, p. 2739-2749, 2010.

DALHOFF, A. Resistance surveillance studies: a multifaceted problem—the fluoroquinolone example. **Infection**, v. 40, n. 3, p. 239-262, 2012.

DE LA ROSA, M. C.; MEDINA, M. R.; VIVAR, C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. **Pharmaceutical Acta Helvetiae**, v. 70, n. 3, p. 227-32, 1995.

DE MARCO, I.; REVERCHON, E. Supercritical antisolvent micronization of cyclodextrins. **Powder Technology**, v. 183, n. 2, p. 239-246, 2008.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DELRIVO, A.; ZOPPI, A.; LONGHI, M. R. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1980-1988, 2011.

DEVENTER, K.; BAELE, G.; VAN EENOO, P.; POZO, O. J.; DELBEKE, F. T. Stability of selected chlorinated thiazide diuretics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 2, p. 519-24, 2009.

DONOVA, M.; NIKOLAYEVA, V.; DOVBNYA, D.; GULEVSKAYA, S.; SUZINA, N. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1981-1992, 2007.

DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385-392, 2008.

DUA, K.; RAMANA, M.; SINGH SARA, U.; HIMAJA, M.; AGRAWAL, A.; GARG, V.; PABREJA, K. Investigation of Enhancement of Solubility of Norfloxacin-Cyclodextrin in Presence of Acidic Solubilizing Additives. **Current drug delivery**, v. 4, n. 1, p. 21-25, 2007.

EL KHATEEB, S. Z.; ABDEL RAZEK, S. A.; AMER, M. Stability-indicating methods for the spectrophotometric determination of norfloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 4, p. 829-840, 1998.

EMA. **European Medicines Agency. Reflection Paper: Formulations of choice for the paediatric population.** London. 2006.

EMMERSON, A.; JONES, A. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. suppl 1, p. 13-20, 2003.

FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 4, p. 403-416 2007.

FANG, X.; BIBART, R. T.; MAYR, S.; YIN, W.; HARMON, P. A.; MCCAFFERTY, J. F.; TYRRELL, R. J.; REED, R. A. Purification and

identification of an impurity in bulk hydrochlorothiazide. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 11, p. 1800-1809, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Parte I. São Paulo: ATHENEU, 2010.

FIGUEIRAS, A.; HOMBACH, J.; VEIGA, F.; BERNKOP-SCHNURCH, A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 339-45, 2009.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of pharmacy**. Londres: Pharmaceutical Press, 2011.

FLYNN, J. T. Pharmacologic management of childhood hypertension: current status, future challenges. **American journal of hypertension**, v. 15, n. S2, p. 30S-33S, 2002.

FRANCO, A. V. M. Recurrent urinary tract infections. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 19, n. 6, p. 861-873, 2005.

FREED, A. L.; SILBERING, S. B.; KOLODSICK, K. J.; ROSSI, D. T.; MAHJOUR, M.; KINGSMILL, C. A. The development and stability assessment of extemporaneous pediatric formulations of Accupril. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1-2, p. 135-44, 2005.

FROEHLICH, P. E.; SCHAPOVAL, E. E. S. Doseamento microbiológico do norfloxacino, método da difusão em ágar (cilindro em placas). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science** v. 12, p. 161-65, 1990.

GAMSIZ, E. D.; MILLER, L.; THOMBRE, A. G.; AHMED, I.; CARRIER, R. L. Modeling the influence of cyclodextrins on oral absorption of low solubility drugs: II. Experimental validation. **Biotechnology and Bioengineering** v. 105, n. 2, p. 421-30, 2010.

GARNERO, C.; AIASSA, V.; LONGHI, M. Sulfamethoxazole:hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex: preparation and characterization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, n. 0, p. 74-79, 2012.

GHOSH, I.; NAU, W. M. The strategic use of supramolecular pKa shifts to enhance the bioavailability of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 9, p. 764-783, 2012.



GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochemica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

GLASS, B. D.; HAYWOOD, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 398-426, 2006.

GONZÁLEZ-CHAMORRO, F.; PALACIOS, R.; ALCOVER, J.; CAMPOS, J.; BORREGO, F.; DÁMASO, D. Urinary tract infections and their prevention. **Actas Urológicas Españolas (English Edition)**, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2012.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): a toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451-1459, 2005.

GRASS, G. M. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1, p. 199-219, 1997.

GRAY, V. A.; ZHENG, J. Y.; SESI, N. N. In Vitro Dissolution Testing and Method Development. **Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products**, p. 265, 2009.

GREBOGI, I. H.; TIBOLA, A. P. O.; BARISON, A.; GRANDIZOLI, C. W.; FERRAZ, H. G.; RODRIGUES, L. N. Binary and ternary inclusion complexes of dapsone in cyclodextrins and polymers: preparation, characterization and evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocylic Chemistry**, v. 73, n. 1-4, p. 467-474, 2012.

GREENWOOD, R. Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 1, p. 55-81, 2003.

GUYOT, M.; FAWAZ, F.; BILDET, J.; BONINI, F.; LAGUENY, A. M. Physicochemical characterization and dissolution of norfloxacin/cyclodextrin inclusion compounds and PEG solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 123, n. 1, p. 53-63, 1995.

HAN, J.; BEETON, A.; LONG, P. F.; WONG, I.; TULEU, C. Physical and microbiological stability of an extemporaneous tacrolimus suspension for paediatric use. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 2, p. 167-72, 2006.

HAUSS, D. J. Oral lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 667-76, 2007.

HELIN-TANNINEN, M.; NAARANLAHTI, T.; KONTRA, K.; OJANEN, T. Enteral suspension of nifedipine for neonates. Part 2. Stability of an extemporaneously compounded nifedipine suspension. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 59-66, 2001.

HERRADOR, M.; GONZÁLEZ, A. G. Potentiometric titrations in acetonitrile-water mixtures: evaluation of aqueous ionisation constant of ketoprofen. **Talanta**, v. 56, n. 4, p. 769-775, 2002.

HEWITT, C. Viewing control structures as patterns of passing messages. **Artificial intelligence**, v. 8, n. 3, p. 323-364, 1977.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, n. 2, p. 117-212, 1965.

HUSSEIN, K.; TURK, M.; WAHL, M. A. Comparative evaluation of ibuprofen/beta-cyclodextrin complexes obtained by supercritical carbon dioxide and other conventional methods. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 3, p. 585-92, 2007.

IBRAHIM, N.; EL-ZAIRY, E. Union disperse printing and UV-protecting of wool/polyester blend using a reactive  $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 244-249, 2009.

JOB, P. Job's method of continuous variation. **Annali di Chimica Applicata**, v. 10, p. 103-203, 1928.

JUG, M.; KOSALEC, I.; MAESTRELLI, F.; MURA, P. Development of low methoxy amidated pectin-based mucoadhesive patches for buccal delivery of triclosan: Effect of cyclodextrin complexation. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1794-1803, 2012.

KADAM, Y.; YERRAMILI, U.; BAHADUR, A.; BAHADUR, P. Micelles from PEO-PPO-PEO block copolymers as nanocontainers for solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 49-57, 2011.

KANG, J.; KUMAR, V.; YANG, D.; CHOWDHURY, P. R.; HOHL, R. J. Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and

cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 163-170, 2002.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 480-495, 2012.

KAYUMBA, P. C.; HUYGHEBAERT, N.; CORDELLA, C.; NTAWUKULIRYAYO, J. D.; VERVAET, C.; REMON, J. P. Quinine sulphate pellets for flexible pediatric drug dosing: formulation development and evaluation of taste-masking efficiency using the electronic tongue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 460-5, 2007.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KHAN, N.; BAKSHI, K. S.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Ameliorative potential of spironolactone in diabetes induced hyperalgesia in mice. **Yakugaku Zasshi**, v. 129, n. 5, p. 593-9, 2009.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. D. A. C. D.; CUNHA, B. C. D. A. **Dicionário terapêutico Guanabara: 2006/2007; Therapeutics dictionary Guanabara: 2006/2007.** 2006.

KRATZ, J.; TEIXEIRA, M.; KOESTER, L.; SIMÕES, C. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 6, p. 531-537, 2011.

KRIEGER, J. N. Urinary tract infections: what's new? **The Journal of urology**, v. 168, n. 6, p. 2351-2358, 2002.

KULSHRESHTHA, A. K.; SINGH, O. N.; WALL, G. M. **Pharmaceutical suspensions: from formulation development to manufacturing**. Springer, 2010. ISBN 1441910875.

KYZAS, G. Z.; LAZARIDIS, N. K.; BIKIARIS, D. N. Optimization of chitosan and  $\beta$ -cyclodextrin molecularly imprinted polymer synthesis for dye adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2012.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273-285, 2005.

LI; ZHANG, Y.-H.; WU, Y.-N.; XIONG, X.-L.; ZHANG, Y.-H. Inclusion complex of trimethoprim with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3, p. 824-829, 2005.

LI; ZHAO; CHAO. Investigation on the inclusion behavior of Norfloxacin with 2-methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 325-331, 2008.

LI, G.; ZHANG, Y. Stereoselective synthesis of the two major metabolites of spironolactone, 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy-7 $\alpha$ -methylthio-17 $\alpha$ -pregn-4-ene-21,17-carbolactone. **Steroids**, v. 72, n. 6-7, p. 569-72, 2007.

LIEBERMAN, H. L.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Hardcover, 1996.

LIPINSKI, C. A. Poor Aqueous Solubility-an Industry Wide Problem in ADME Screening. **American Pharmaceutical Review**, v. 5, p. 82-85, 2002.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S. B.; BREWSTER, M. E.; KONRÁÐSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 10, p. 2532-2546, 2007.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. In Press, n. 0, 2012.

MACHÍN, R.; ISASI, J. R.; VÉLAZ, I.  $\beta$ -Cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2024-2030, 2012.

MADY, F. M.; ABOU-TALEB, A. E.; KHALED, K. A.; YAMASAKI, K.; IOHARA, D.; TAGUCHI, K.; ANRAKU, M.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Evaluation of carboxymethyl-beta-cyclodextrin with acid function: improvement of chemical stability, oral bioavailability and bitter taste of famotidine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, n. 1-2, p. 1-8, 2010.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. Nova Iorque: Vch New York etc., 1992.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 2003.

MCRORIE, T. Quality drug therapy in children: formulations and delivery. **Drug information journal**, v. 30, n. 4, p. 1173-1177, 1996.

MENDES, C.; COSTA, A. P.; OLIVEIRA, P. R.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 4, p. 813-820, 2013.

MESSNER, M.; KURKOV, S. V.; JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 199-208, 2010.

MILLER, O.; HEMPHILL, R. R. UNINARY TRACT INFECTION AND PYELONEPHRITIS. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 655-674, 2001.

MIRANDA, J. C. D.; MARTINS, T. E. A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H. G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665-681, 2011.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3<sup>a</sup> ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.

MOLLICA, J. A.; REHM, C. R.; SMITH, J. B.; GOVAN, H. K. Hydrolysis of benzothiadiazines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1380-1384, 1971.

MOORE, J. W.; FLANNER, H. H. Mathematical comparison of curves with an emphasis on in-vitro dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, p. 64-74, 1996.

MURAKAMI, F. S.; MENDES, C.; BERNARDI, L. S.; PEREIRA, R. N.; VALENTE, B. R.; CRUZ, A. P.; FRANCHI, S. M.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e avaliação de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de Omeprazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 519-527, 2008.

MUSA, K. A. K.; ERIKSSON, L. A. Theoretical assessment of norfloxacin redox and photochemistry. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 40, p. 10803-10810, 2009.

NEU, H. C. Urinary tract infections. **The American Journal of Medicine**, v. 92, n. 4, Supplement 1, p. S63-S70, 1992.

NORRBY, S. R. Useful agents in the management of urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 4, n. 2, p. 129-134, 1994.

OLIVEIRA, P. R.; BERNARDI, L. S.; MURAKAMI, F. S.; MENDES, C.; SILVA, M. A. S. Thermal characterization and compatibility studies of norfloxacin for development of extended release tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 741-745, 2009.

ONNAINTY, R. E.; SCHENFELD, E. M.; QUEVEDO, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; LONGHI, M. R.; GRANERO, G. E. Characterization of the Hydrochlorothiazide:  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. Experimental and Theoretical Methods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 1, p. 206-217, 2012.

PANDOLFINI, C.; BONATI, M. A literature review on off-label drug use in children. **European Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 9, p. 552-8, 2005.

PATEL, M. N.; JOSHI, H. N.; PATEL, C. R. DNA interaction, in vitro antimicrobial and SOD-like activity of copper(II) complexes with norfloxacin

and terpyridines. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 701, p. 8-16, 2012.

PATHAK, S. M.; MUSMADE, P.; DENGLE, S.; KARTHIK, A.; BHAT, K.; UDUPA, N. Enhanced oral absorption of saquinavir with Methyl-Beta-Cyclodextrin-Preparation and in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3-4, p. 440-51, 2010.

PINA, E.; FERREIRA, E.; MARQUES, A.; MATOS, B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 10, p. 27-39, 2010.

PITHA, J.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners. **Controlled drug delivery**, v. 1, p. 125-148, 1983.

PO, H. N.; SENOZAN, N. The Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 11, p. 1499, 2001.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 333-339, 2004.

RAJARAM, R.; SUNDARARAJALU, K. N.; MEENAKSHISUNDARAM, S. Unusual Excited State Characteristics of 6-aminobenzothiazole with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of fluorescence**, v. 21, n. 2, p. 521-529, 2011.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.386-389, 2012.

RASHEED, A.; KUMAR, A.; SRAVANTHI, V. Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567-598, 2008.

REVELLE, L. K.; MUSSER, S. M.; ROWE, B. J.; FELDMAN, I. C. Identification of chlorothiazide and hydrochlorothiazide UV-A photolytic decomposition products. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 5, p. 631-634, 1997.

RIBEIRO, L. S.; FALCAO, A. C.; PATRICIO, J. A.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. Cyclodextrin multicomponent complexation and controlled release delivery strategies to optimize the oral bioavailability of vinpocetine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2018-28, 2007.

RICHTERICH, R. Natriuretic potency of hydrochlorothiazide in humans. **Experientia**, v. 14, n. 12, p. 458-458, 1958.

ROSS, D. L.; RILEY, C. M. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 63, n. 3, p. 237-250, 1990.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6<sup>a</sup> ed. London: Pharmaceutical Press, p.888, 2009.

SAMI, F.; PHILIP, B.; PATHAK, K. Effect of Auxiliary Substances on Complexation Efficiency and Intrinsic Dissolution Rate of Gemfibrozil- $\beta$ -CD Complexes. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 27-35, 2010.

SELVAM, S.; ANDREWS, M. E.; MISHRA, A. K. A photophysical study on the role of bile salt hydrophobicity in solubilizing amphotericin B aggregates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4153-60, 2009.

SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 8, p. 1641-1665, 2006.

SHAH, V. P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, J. P. In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor,  $f_2$ . **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 889-896, 1998.

SHILLINGFORD, C. A.; VOSE, C. W. Effective decision-making: progressing compounds through clinical development. **Drug discovery today**, v. 6, n. 18, p. 941-946, 2001.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; CARACELLI, I. **Princípios de análise instrumental**. 2002.

SMETANOVÁ, L.; STETINOVA, V.; SVOBODA, Z.; KVETINA, J. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 54, n. 1, p. 3, 2011.



SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

STRICKLEY, R. G.; IWATA, Q.; WU, S.; DAHL, T. C. Pediatric drugs--a review of commercially available oral formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 5, p. 1731-74, 2008.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: The complete drug reference**. 36<sup>a</sup>. Londres: Pharmaceutical press 2011.

SYROESHKIN, A. V.; POPOV, P. I.; GREBENNIKOVA, T. V.; FROLOV, V. A.; PLETENEVA, T. V. Laser diffraction for standardization of heterogeneous pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 927-30, 2005.

SZABADOS-NACSA, Á.; SIPOS, P.; MARTINEK, T.; MÁNDITY, I.; BLAZSÓ, G.; BALOGH, Á.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; AIGNER, Z. Physico-chemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of loratadine: dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 2, p. 294-300, 2011.

TABLET, C.; MATEI, I.; HILLEBRAND, M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations. **Stoichiometry and research-The importance of quantity in biomedicine, InTech**, p. 47-76, 2012.

TAFAZZOLI, M.; GHIASI, M. Structure and conformation of  $\alpha$ ,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin in solution: Theoretical approaches and experimental validation. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 1, p. 10-15, 2009.

TAGLIARI, M. P.; STULZER, H. K.; MURAKAMI, F. S.; KUMINEK, G.; VALENTE, B.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, M. A. S. Development and validation of Stability-Indicating LC method to quantify hydrochlorothiazide in oral suspension for pediatric use. **Chromatographia**, v. 67, p. 647-652, 2008.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; JÓZAN, M.; HERMECZ, I.; SZÁSZ, G. Lipophilicity of antibacterial fluoroquinolones. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 89-96, 1992.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization-part I: phase solubility

diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2012.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization-part II: x-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 2012.

TAVELIN, S.; TAIPALENSUU, J.; SÖDERBERG, L.; MORRISON, R.; CHONG, S.; ARTURSSON, P. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 3, p. 397-405, 2003.

UEDA, S.; YAMAOKA, K.; YUI, J.; SHIGEMATSU, A.; NAKAGAWA, T. Evaluation of capacity-limited first-pass effect through liver by three-points sampling in portal and hepatic veins and systemic artery. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 852-7, Jun 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 30. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, USA: 2007.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology and infection**, v. 11, n. 4, p. 256-280, 2005.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23-24, p. 1068-75, 2007.

VEIGA, F.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, L. S. S. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva, 2006.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J.; KEDZIEREWICZ, F.; SOUSA, A.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1996.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VILLERS, A. Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 112, p. 435-438, 1891.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAİN, H. G.; GRANT, D. J. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

WAGENLEHNER, F. M.; WEIDNER, W.; NABER, K. G. Chlamydial infections in urology. **World journal of urology**, v. 24, n. 1, p. 4-12, 2006.

WANG, X.; CHEN, C.; HUO, D.; QIAN, H.; DING, Y.; HU, Y.; JIANG, X. Synthesis of  $\beta$ -cyclodextrin modified chitosana-poly(acrylic acid) nanoparticles and use as drug carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 361-369, 2012.

WANG, X.; ZHAO, X.; MALIK, M.; DRLICA, K. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 520-524, 2010.

WELLING, P. G. Pharmacokinetics of the thiazide diuretics. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 7, n. 6, p. 501-535, 1986.

WOODS, D. J. Extemporaneous Formulations - Problems and Solutions **Paediatric and Perinatal Drug Therapy**, v. 1, p. 25-29, 1997.

YAMANA, T.; MIZUKAMI, Y.; TSUJI, A.; ICHIMURA, F. Studies on the stability of drugs. XX. Stability of benzothiadiazines. Studies on the hydrolysis of hydrochlorothiazide in the various pH solutions. **Yakugaku Zasshi**, v. 89, n. 5, p. 740-4, 1969.

YANG, L.-J.; CHEN, W.; MA, S.-X.; GAO, Y.-T.; HUANG, R.; YAN, S.-J.; LIN, J. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 629-637, 2011.

YOON, E. Y.; DAVIS, M. M.; ROCCHINI, A.; KERSHAW, D.; FREED, G. L. Medical management of children with primary hypertension by pediatric subspecialists. **Pediatric Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 147-153, 2009.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H.; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis

for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921-5, 2002.

YU, X.; ZIPP, G. L.; DAVIDSON, G. W. R. The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: Estimation of heat of fusion. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, p. 522-527, 1994.

ZHAO, D.; ZHAO, L.; ZHU, C.; TIAN, Z.; SHEN, X. Synthesis and properties of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin polymer crosslinked by citric acid with PEG-400 as modifier. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 1, p. 125-130, 2009.

---

---

**APÊNDICE A – Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação da HCTZ e do NFX nos complexos de inclusão por cromatografia líquida de alta eficiência**

---

---



## 1. INTRODUÇÃO

A quantificação do fármaco é uma análise essencial em estudos de estabilidade e de formulações farmacêuticas, desde o desenvolvimento inicial até o controle de qualidade de rotina do produto acabado. Para tanto, um processo definido e documentado que forneça evidências de que o método é adequado para o uso pretendido, é de fundamental importância (SHABIR, 2003; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2010).

A cromatografia líquida tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de componentes presentes em vários tipos de amostras, como em uma formulação farmacêutica. Por meio da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção podem-se analisar amostras em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução e sensibilidade (SHABIR et al., 2007).

O objetivo dos experimentos de validação é justamente determinar se o método é adequado para o propósito pela execução prática do método e análise dos resultados com critérios pré-determinados como precisão, exatidão, linearidade, especificidade, intervalo e robustez. Desta forma, a validação de uma metodologia é definida como o ato documentado que atesta todos estes procedimentos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2010). Os experimentos de validação são periodicamente sugeridos pelas autoridades reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA), The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e os Compêndios Oficiais (BRASIL, . 2003; ICH, 2005; USP, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Na literatura, a quantificação por CLAE de complexos de inclusão ainda não é metodologia muito aplicada, apesar de se tratar de uma das técnicas mais populares e confiáveis para a quantificação de fármacos. Alguns esforços já foram feitos no sentido de desenvolver complexos de inclusão de CD e HCTZ ou NFX, entretanto não existem relatos de quantificação destes fármacos nos complexos de inclusão.

Dado o exposto, o presente apêndice tem como objetivo descrever o desenvolvimento e a validação das metodologias analíticas para a quantificação da HCTZ e do NFX em seus respectivos complexos de inclusão com CDs.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

Os complexos de inclusão foram obtidos por coevaporação, malaxagem seguida de liofilização ou *spray-dryer*. Os fármacos foram extraídos dos complexos pelo método de lavagem com solvente. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Para as análises, água ultrapura foi obtida por sistema gradiente Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

### 2.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Um cromatógrafo Shimadzu LC 10A (Kyoto, Japão) foi utilizado, equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV, detector de fluorescência RF-10A e auto injetor Jasco AS-2055 Plus. As áreas foram integradas automaticamente pelo software Shimadzu Class VP® versão 6.12.

#### 2.2.1 Desenvolvimento do método para quantificação da hidroclorotiazida

Para a quantificação da HCTZ o experimento foi realizado em fase reversa utilizando-se coluna analítica Phenomenex (Torrance, Estados Unidos) Synergi fusion C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 4 μm) na temperatura de 40 °C isocraticamente, e uma pré-coluna (4,0mm x 3,0 mm) para proteção da coluna analítica. A fase móvel constituiu numa mistura de água pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila (80:20 v/v), detecção foi realizada em UV a 260 nm, volume de injeção de 50 μL e fluxo de 1 mL/min. A solução estoque foi armazenada em temperaturas de 2 °C – 8 °C protegidos da luz. Soluções padrões de trabalho foram preparadas diariamente.

A solução estoque de HCTZ foi preparada pesando-se 25 mg em balão volumétrico de 25 mL e diluído ao volume com acetonitrila, para obtenção de uma concentração estoque de 1mg/mL.

A amostra foi preparada por meio da extração da HCTZ do complexo de inclusão pelo método de lavagem com solvente (HUSSEIN; TURK; WAHL, 2007). Para determinar a quantidade de fármaco livre, uma alíquota (5 mg) de cada produto seco obtido foi misturada com acetona (5 mL). O sobrenadante foi separado e seco sob vácuo na temperatura de 50 °C, reconstituído em fase móvel e analisado por CLAE. O teor de HCTZ



complexado foi determinado dissolvendo-se o complexo, previamente lavado, com 400  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), e 9,6 mL de metanol. Após 12 horas, a  $\beta$ CD precipita e o sobrenadante foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm, removido, diluído em fase móvel e analisado por CLAE.

### **2.2.2 Desenvolvimento do método de quantificação do norfloxacin**

Para a quantificação do NFX a detecção foi feita em comprimento de onda fluorescente com 278 nm de excitação e 445 nm de emissão. O sistema foi operado isocroticamente a 40 °C com fase móvel composta de tampão fosfato (25 mM, pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico)/acetonitrila (87:13 v/v). Esta foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m. Uma pré-coluna (4,0mm x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna. Os experimentos foram realizados em fase reversa utilizando-se coluna analítica Phenomenex (Torrance, Estados Unidos) Synergi fusion C<sub>18</sub> (150 mm×4,6 mm, 4  $\mu$ m) e fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L para o padrão e as amostras.

A solução estoque de NFX foi preparada pesando-se 25 mg, transferindo-se para balão de 25 mL, dissolvendo-se com 0,1 mL de ácido acético e diluindo-se ao volume com metanol para obtenção de concentração final de 1 mg/mL. A solução estoque foi armazenada em temperatura ambiente (25 °C) e protegida da luz. Soluções padrões de trabalho foram preparadas diariamente.

A amostra foi preparada por meio da extração do NFX dos complexos pelo método da lavagem com n-hexano (HUSSEIN; TURK; WAHL, 2007). Para determinar a quantidade de fármaco livre, uma alíquota (5mg) de cada produto seco obtido foi misturada com n-hexano contendo 2% de ácido acético. O sobrenadante foi separado e seco sob vácuo na temperatura de 50 °C, reconstituído em fase móvel e analisado por CLAE. Para quantificação do NFX complexado foi dissolvido o complexo, previamente lavado com 400  $\mu$ L de dimetilsulfóxido, em água acidificada (2 % de ácido acético). Após 12 horas, a  $\beta$ CD precipita e o sobrenadante foi centrifugado durante 10 min a 3000 rpm, removido, diluído em fase móvel e analisado em CLAE.

## **2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

O desenvolvimento e validação do método analítico foram realizados de acordo com o preconizado pela ICH (ICH, 2005). O método foi validado para quantificação do NFX nos complexos de inclusão com a  $\beta$ CD nos

seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, e robustez.

### 2.3.1 Especificidade

A especificidade de um método baseia-se na habilidade em determinar o analito na presença de seus produtos de degradação, excipientes e impurezas. A interferência da  $\beta$ CD, único excipiente utilizado no complexo de inclusão, foi avaliada por meio da injeção de uma solução de  $\beta$ CD em concentração equivalente a utilizada na preparação dos complexos.

A capacidade de o método ser indicador de estabilidade foi determinada, ainda, submetendo-se as soluções estoque de fármacos (1 mg/mL) a degradação acelerada como condições ácidas, básicas, oxidativas e fotolíticas. Ácido clorídrico 1M foi utilizado para verificar a hidrólise ácida. A adição de hidróxido de sódio 0,1M ou 1M foi realizada para avaliar a hidrólise básica. Ambas as hidrólises foram feitas em refluxo a 100 °C por 24 h, e neutralizadas com seu respectivo ácido ou base. A degradação oxidativa foi induzida pela armazenagem da solução de amostra em peróxido de hidrogênio a 20% em temperatura ambiente. Estudos de fotodegradação foram realizados expondo a matéria-prima à luz, em câmara de fotoestabilidade, com emissão de 200 watt/h m<sup>2</sup> de radiação UV e radiação de 1.200.000 lux.h na região do visível. Depois destes procedimentos, as amostras foram diluídas em fase móvel até a concentração teórica de 10 µg/mL para a HCTZ e 15 µg/mL para o NFX.

### 2.4.2 Linearidade e faixa de variação

Linearidade foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, em seis concentrações na faixa de 0,25 a 50 µg/mL para a HCTZ (0,25; 1; 5; 10; 25; 50 µg/mL) e em sete concentrações na faixa de 1 a 30 µg/mL para o NFX (1; 5; 10; 15; 20; 25; 30 µg/mL), todas preparadas em fase móvel. Antes do início das análises, a coluna foi equilibrada com pelo menos 20 minutos de fluxo de fase móvel pelo sistema. A área do pico encontrada nos cromatogramas foi plotada contra as concentrações teóricas para obter a curva analítica. O método dos mínimos quadrados foi empregado para obter a equação de calibração e o coeficiente de correlação, ainda foi realizada a verificação da regressão.

### 2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada por meio da precisão intermediária e da repetibilidade. A precisão intermediária foi realizada pela análise intradia e interdias, enquanto que a repetibilidade foi avaliada pela

determinação de seis análises da mesma concentração, no mesmo dia e sob as mesmas condições. A exatidão foi definida pela recuperação de quantidades conhecidas da substância referência adicionada à amostra contendo 5 µg/mL de HCTZ e 7,5 µg/mL de NFX. Os níveis adicionados foram 3 µg/mL, 5 µg/mL, e 7 µg/mL para a HCTZ e 4,5; 7,5 e 10,5 µg/mL correspondendo a 80%, 100% e 120% da concentração escolhida, respectivamente. Cada solução foi preparada em triplicata e injetada três vezes. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação.

#### 2.4.4 Limite de detecção e quantificação

Parâmetros como limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) não são exigidos para a quantificação do fármaco, entretanto, é sempre útil demonstrar a sensibilidade do método e da análise. Os LD e LQ foram calculados pela curva analítica levando-se em conta o desvio padrão do intercepto e a média da inclinação das 3 curvas obtidas, conforme preconizado pelo ICH (ICH, 2005). Os valores de LD e LQ foram preditos utilizando as equações 1 e 2. Os mesmos foram confirmados em análise experimental.

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \quad (1)$$

$$LD = \frac{3\sigma}{s} \quad (2)$$

#### 2.4.5 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por meio da variação nas seguintes condições cromatográficas: fluxo, temperatura do forno e composição da fase móvel.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA HCTZ

##### 3.1.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas

O método para determinação da HCTZ nos complexos de inclusão com βCD foi desenvolvido em fase reversa por se tratar de compostos orgânicos. A HCTZ é uma base fraca e apresenta dois valores de pK<sub>a</sub> (pK<sub>a1</sub> 7,0 e pK<sub>a2</sub> 9,2) (KADAM et al., 2011). Compostos ionizados tendem a formar caudas pronunciadas além de não ser recomendável sua utilização em fase reversa, uma vez que a ionização tem maior afinidade pela fase móvel (polar). Desta forma, vários pHs ácidos na faixa de 2 a 5 foram avaliados de modo a obter as melhores condições cromatográficas. Outras

variações como colunas cromatográficas, temperatura e solventes orgânicos (acetonitrila, metanol e etanol) também foram avaliadas, sempre levando em consideração a preservação da estabilidade da HCTZ. A fase móvel que forneceu as melhores condições cromatográficas foi água pH 3,0 e acetonitrila na proporção de 80:20 v/v, eluída em coluna Phenomenex C<sub>18</sub> proporcionando picos com boa simetria e resolução além de um tempo de retenção rápido e reprodutível de 4,5 minutos.

### 3.1.2 Seleção do comprimento de onda de absorção

A seleção do comprimento de onda foi realizada em espectrofotômetro por meio da diluição da solução estoque de HCTZ a uma concentração de 5 µg/mL em fase móvel previamente definida. O espectro revelou uma maior absorção no comprimento de onda de 260 nm e foi, portanto selecionado. Um cromatograma típico obtido pelo método pode ser observado na Figura 1.

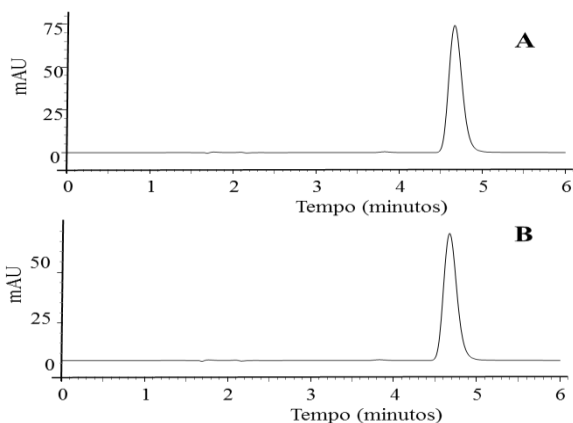


Figura 1. Cromatograma padrão da HCTZ (A) e HCTZ extraída do complexo de inclusão obtido por malaxagem seguida de liofilização.

## 3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA HCTZ

### 3.2.1 Especificidade

A especificidade do método é a habilidade de medir o analito na presença de suas potenciais impurezas, produtos de degradação ou excipientes da formulação (ICH, 2005). Uma solução de  $\beta$ CD pura, na mesma concentração utilizada nas formulações foi avaliada no método desenvolvido para a HCTZ e não apresentou absorção neste comprimento de onda. A capacidade indicadora de estabilidade do método foi testada

submetendo-se uma solução concentrada de HCTZ a condições de hidrólise ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica e os cromatogramas obtidos estão demonstrados na Figura 2.

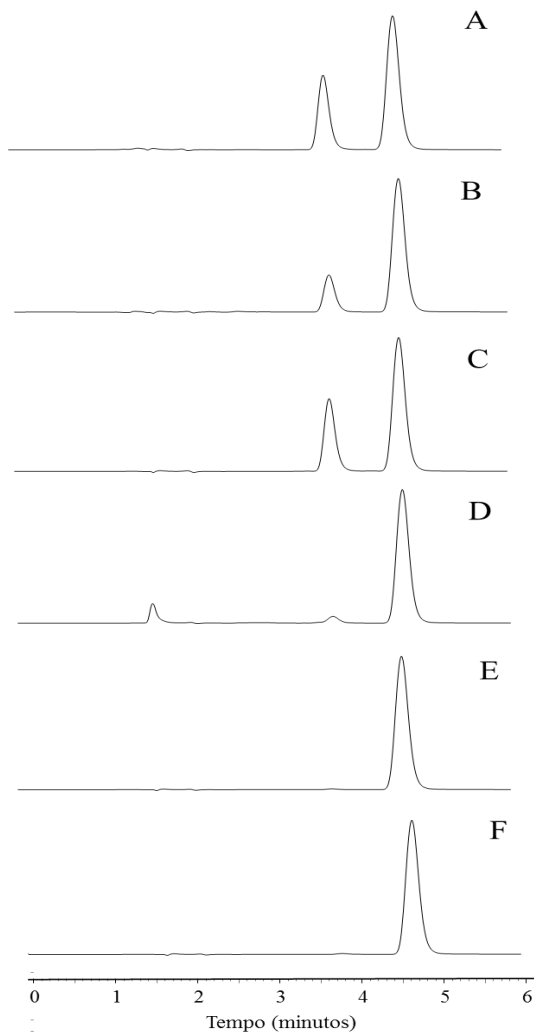


Figura 2. Cromatograma de degradação obtido para a HCTZ em: (A) HCl 1M, (B) NaOH 0,1M, (C) Água, (D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%, (E) exposição à luz UV, (F) exposição à luz VIS.

Os cromatogramas obtidos revelam picos dos produtos de degradação bem separados do pico principal da HCTZ. Assim, demonstrou-se a especificidade do método proposto para a análise da HCTZ no complexo de inclusão.

### 3.2.2 Linearidade

Para definir a linearidade da resposta do detector do instrumento à concentração conhecida de HCTZ, soluções foram preparadas na faixa entre 0,25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . A equação obtida a partir da reta média foi  $y = 86578x + 29478$  com coeficiente de correlação de 0,9994, conforme figura 3. A análise de variância aplicada e a plotagem dos resíduos revelam a linearidade do método ( $F_{\text{calculado}} 3012 > F_{\text{critico}} 6,6 \times 10^{-7}$  e  $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Com a linearidade estabelecida, esta foi utilizada para determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da HCTZ.

O valor encontrado para LD foi de 0,02  $\mu\text{g/mL}$  e LQ 0,06  $\mu\text{g/mL}$ . Valores baixos de LD e LQ são importantes para a quantificação dos estudos de permeabilidade, uma vez que a HCTZ é um fármaco classe BCS IV e apresenta baixa permeabilidade.

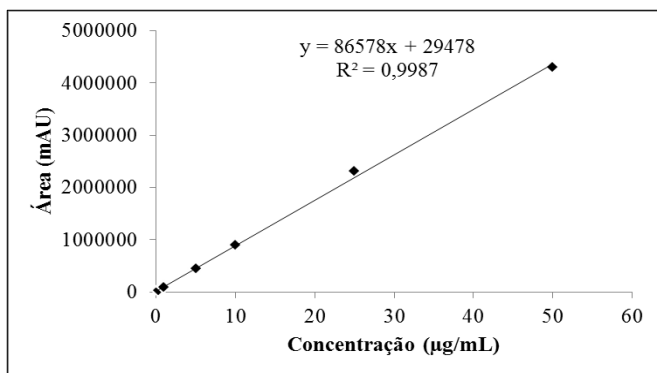


Figura 3. Representação gráfica da curva de calibração média da HCTZ obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 3.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada de acordo com o recomendado pela resolução e pelos padrões do ICH (BRASIL, . 2003; ICH, 2005) pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR). Foram considerados como limite aceitável valores menores que 2%. Para tanto, foi

realizada a repetibilidade de seis determinações da mesma concentração de uma solução de complexo de HCTZ (10 µg/mL) sob as mesmas condições e a precisão intradia e interdias de 3 concentrações diferentes (5, 10 e 25 µg/mL) no mesmo dia e em dias seguidos, respectivamente. Os resultados estão sumarizados na tabela 1 e pode-se observar a precisão do método uma vez que os valores de DPR estão dentro do critério de aceitação.

### 3.2.5 Exatidão

A exatidão foi calculada a partir da determinação da HCTZ nas soluções preparadas de complexo de inclusão pelo método de adição de padrão e expressa em termos de porcentagem de recuperação. Volumes variáveis de solução padrão foram adicionados a uma solução de complexo para obter valores de 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho da HCTZ, correspondente a concentração final de 8 µg/mL, 10 µg/mL e 12 µg/mL respectivamente. Os resultados estão expressos na tabela 2.

### 3.2.6 Robustez

A avaliação da robustez foi verificada por meio de alterações pequenas nos parâmetros do método, como fluxo, pH e proporção da fase móvel. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3. Na execução das análises de quantificação do fármaco nos complexos de inclusão, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os valores de DPR encontram-se dentro do preconizado, comprovando a robustez do método para os parâmetros utilizados.

Tabela 1. Dados da repetibilidade e da precisão intradia e interdias para HCTZ nos complexos de inclusão.

Amostra	Precisão intradias		Precisão interdias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
1 (n=3)	99,25		99,47	
	101,29	1,02	101,09	0,81
	100,35		100,16	
Repetibilidade				
2 (n=6)	100,21		100,98	
	101,45		99,07	0,95
	99,38		99,49	

Tabela 2. Resultado do ensaio de exatidão para a HCTZ.

<b>Quantidade adicionada<sup>a</sup></b>	<b>Concentração final teórica<sup>b</sup></b>	<b>Concentração média encontrada</b>	<b>Recuperação média</b>	<b>DPR</b>
<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
3,0 (80%)	8	8,17	104,37	0,33
5,0 (100%)	10	10,26	103,72	0,13
7,0 (120%)	12	11,87	100,24	0,25

<sup>a</sup> Concentração de padrão adicionado

Tabela 3. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da HCTZ por CLAE.

<b>Variável</b>	<b>Faixa investigada</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Fluxo (mL/min)	0,9	100,01	0,12
	1,0	99,85	0,23
	1,1	99,92	0,16
pH do tampão	2,9	99,51	0,27
	3,0	99,62	0,17
	3,1	99,82	0,25
Proporção da fase móvel (água:acetonitrila)	78:22	100,12	0,32
	80:20	100,72	0,12
	82:18	99,78	0,35

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO NFX

#### 3.3.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas

O método por CLAE em fase reversa foi desenvolvido para fornecer uma determinação eficiente e segura do NFX nos complexos de inclusão obtidos. Para obter as melhores condições cromatográficas, variações na composição da fase móvel e diferentes tipos de colunas foram empregados. Estas condições levaram em conta os parâmetros físico-químicos do fármaco, garantindo sua estabilidade. Como condições cromatográficas foram avaliadas a resposta de distintos solventes orgânicos (acetonitrila e



metanol) e água, em diferentes valores de pH para a fase aquosa. Os valores de pH devem ser cuidadosamente avaliados, pois no caso do NFX, apenas valores extremos de pH conferem a não ionização da molécula, em sua maioria (figura 2, capítulo 4). Portanto, fase móvel com pH 3, por exemplo, é uma condição aceitável para utilização no equipamento bem como para o fármaco. A coluna, fluxo e proporção da fase móvel foram ajustados para garantir um método de quantificação com adequada simetria de pico em tempo razoável de retenção do fármaco na coluna. A utilização do tampão fosfato (25 mM, pH 3) em combinação com acetonitrila (87:13 v/v) a 40 °C, fase móvel simples e muito utilizada na área, resultou em tempo de retenção relativamente curto de 6,5 minutos, como pode ser observado no cromatogramas típicos (figura 4). As condições otimizadas do método foram validadas para a análise do NFX nos complexos de inclusão preparados com  $\beta$ CD.

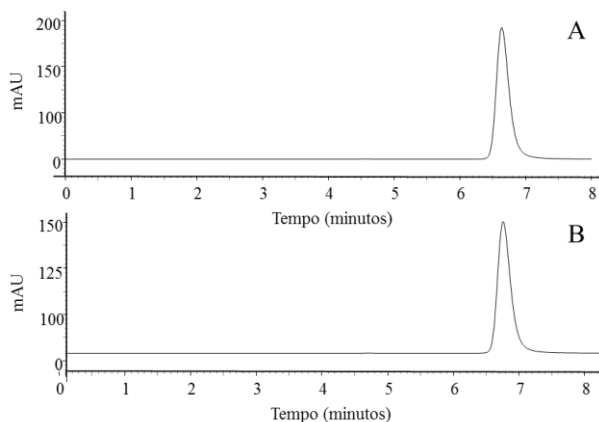


Figura 4. Cromatograma padrão de NFX (A) e NFX extraído do complexo malaxagem seguido de liofilização (B).

### 3.3.2 Seleção do comprimento de onda de excitação e emissão

Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram estabelecidos, fixando-se o comprimento de excitação (278 nm) e fazendo a varredura do comprimento de emissão na região entre 400 a 500 nm. Desta forma, foi observado um máximo de emissão em 445 nm. Estes foram escolhidos para detecção ótima para quantificação do NFX, minimizando a interferência da fase móvel.

## 3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO NFX

### 3.4.1 Especificidade

O fármaco foi submetido a condições de estresse para verificar a degradação forçada da molécula. Amostras foram submetidas à HCl de diferentes molaridades para analisar a hidrólise ácida que o fármaco pode sofrer. O cromatograma obtido (1A) revela uma diminuição da área do pico para o NFX com a presença de um pico adicional bem descrito como o derivado descarboxilado, preparado posteriormente segundo método descrito por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA; BERNARDI; MENDES; et al., 2009) e representado na Figura 5.

Estes resultados indicam que o método proposto é específico e indicador de estabilidade para a análise de NFX nos complexos de inclusão sob as condições em estudo.

### 3.4.2 Linearidade

A linearidade da resposta do detector frente à variação da concentração do analito foi avaliada pela análise de soluções padrões a sete diferentes concentrações na faixa de 1 µg/mL até 30 µg/mL. Coeficientes de correlação e as inclinações foram obtidos plotando-se a área do cromatogramas obtida *versus* concentração teórica do fármaco, e cada curva de linearidade foi submetida à análise de regressão.

A curva de linearidade média obtida está representada na Figura 6 ( $y = 278941x - 887,76$ ) com um coeficiente de correlação de 0,9996. A análise de variância aplicada demonstrou que não houve desvio da linearidade ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ). Além disso, a plotagem dos resíduos exibiu padrões de distribuição normais com os resíduos passando pelo teste de distribuição ( $p < 0,05$ ), em que tudo evidencia que o método é linear nesta faixa.

### 3.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Com a linearidade estabelecida, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do NFX foram determinados. O método do desvio padrão residual foi aplicado e os valores de LD e LQ foram preditos utilizando as equações 1 e 2. Os valores encontrados foram de 0,79 µg/mL para LQ e de 0,26 µg/mL para LD.

### 3.4.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo DPR. A repetibilidade foi obtida pela determinação da concentração de trabalho do NFX em seis amostras de complexo independentes (15 µg/mL), no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária do método foi

avaliada pela determinação de três amostras a concentrações diferentes no mesmo dia (intradia) e em três diferentes dias (interdias). Os valores obtidos estão expressos na tabela 4. Observa-se que o método apresentou-se preciso, pois cada repetição apresentou valores de DPR menor que 2%.

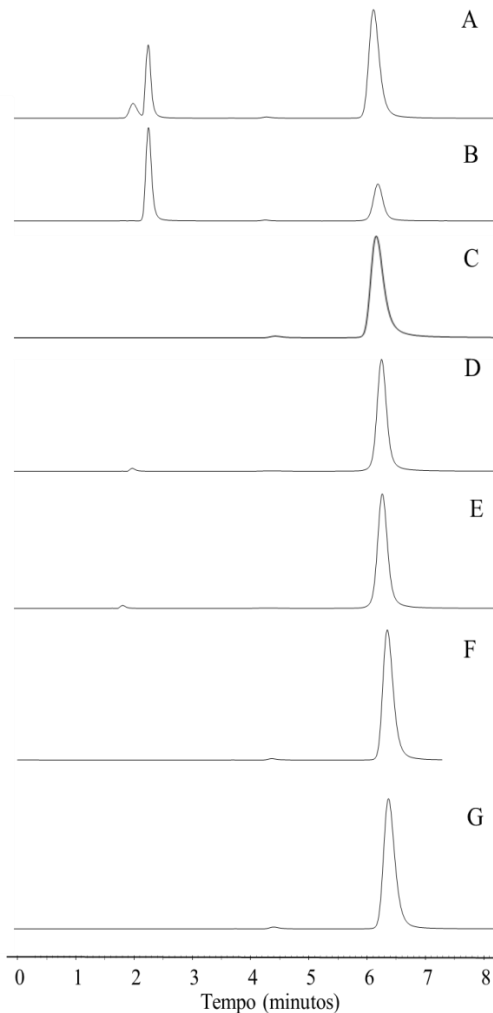


Figura 5. Cromatograma de degradação obtido para o NFX em: (A) HCl 1M, (B) NFX descarboxilado, (C) NaOH 1M, (D) Água, (E) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%, (F) luz UV, (G) luz VIS.

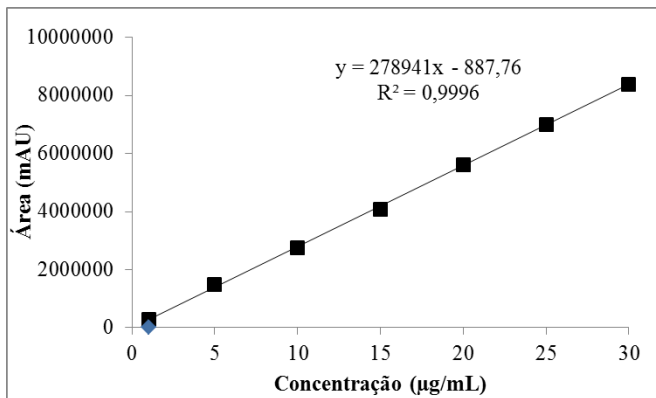


Figura 6. Representação gráfica da curva de calibração média do NFX obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Tabela 4. Dados da repetibilidade e da precisão intradia e interdias para NFX nos complexos de inclusão.

Amostra	Precisão intradias		Precisão interdias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
1 (n=3)	101,7		98,73	
	99,94	1,05	99,34	0,83
	99,82		100,37	
Repetibilidade				
2 (n=6)	100,67		101,22	
	100,93		99,94	1,13
	98,72		98,58	

### 3.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela determinação do analito nas soluções preparadas pelo método de adição de padrão e expressada em termos de porcentagem de recuperação. Volumes variáveis de solução padrão foram adicionados a uma solução de complexo para obter valores de 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho do NFX, correspondente a 12 µg/mL, 15 µg/mL e 18 µg/mL respectivamente. Os resultados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Resultado do ensaio de exatidão para o NFX.

<b>Quantidade adicionada<sup>a</sup></b>	<b>Concentração<sup>b</sup></b>	<b>Concentração média encontrada</b>	<b>Recuperação média</b>	<b>DPR</b>
<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
4,5 (80%)	12	12,07	101,26	0,03
7,5 (100%)	15	14,04	99,24	1,36
10,5 (120%)	18	17,96	99,54	1,08

<sup>a</sup> Concentração de padrão adicionado

<sup>b</sup> Concentração média da triplicata

### 3.4.6 Robustez

Para demonstrar a robustez do método, modificações nos parâmetros do sistema foram realizadas fazendo mudanças nas condições cromatográficas como: alteração no fluxo de fase móvel em cerca de  $\pm 0,1$  mL/min, mudança da temperatura do forno da coluna em  $\pm 2$  °C e ainda na proporção da fase móvel em  $\pm 2\%$  da sua composição orgânica. Os resultados estão sumarizados na tabela 6. A estabilidade da solução analítica também foi avaliada, garantindo-se estável por pelo menos 48 h quando armazenada a temperatura ambiente.

Tabela 6. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do NFX por CLAE.

<b>Variável</b>	<b>Faixa investigada</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Fluxo (mL/min)	0,9	100,40	0,97
	1,0	99,80	0,36
	1,1	100,18	0,42
Temperatura	38	100,92	1,26
	40	99,54	0,36
	42	100,68	1,07
Proporção da fase móvel (tampão:acetonitrila)	82:18	100,12	0,32
	84:16	100,72	0,88
	86:14	99,86	0,74

Como resultado, não ocorreram mudanças significativas nos padrões cromatográficos levando em consideração a porcentagem de fármaco nas condições experimentais testadas, assegurando a robustez do método.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados discutidos neste apêndice demonstram que o método desenvolvido para a quantificação da HCTZ e do NFX nos complexos de CD é exato, robusto e apresenta linearidade e precisão satisfatória, sem interferência da CD utilizada na formulação bem como dos produtos de degradação. Os métodos desenvolvidos e validados por CLAE revelam resultados muito confiáveis na quantificação da quantidade de fármaco complexada, tornando-se uma ferramenta fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

#### 5. REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, v.6, p.427-430, 2010.

BRASIL. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília, Diário Oficial da União 29 mai. 2003.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Parte I. São Paulo: ATHENEU, 2010.

HUSSEIN, K.; TURK, M.; WAHL, M. A. Comparative evaluation of ibuprofen/beta-cyclodextrin complexes obtained by supercritical carbon dioxide and other conventional methods. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 3, p. 585-92, 2007.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1),(November 2005) International Conference on Harmonization**. Geneva, Switzerland. GUIDELINE, I. H. T. 2005.

KADAM, Y.; YERRAMILI, U.; BAHADUR, A.; BAHADUR, P. Micelles from PEO–PPO–PEO block copolymers as nanocontainers for

solubilization of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 49-57, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; BERNARDI, L. S.; MENDES, C.; CARDOSO, S. G.; SANGOI, M. A.; SILVA, M. R. Liquid chromatographic determination of norfloxacin in extended-release tablets. **Journal of Chromatography Sciences**, v. 47, n. 9, p. 739-44, Oct 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; JOHN LOUGH, W.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 30. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, USA: 2007.