

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Monika Piazzon Tagliari

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SUSPENSÕES
FARMACÊUTICAS CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA. AVALIAÇÃO DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS NO HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO**

Florianópolis

2008

Monika Piazzon Tagliari

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SUSPENSÕES
FARMACÊUTICAS CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA. AVALIAÇÃO DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS NO HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva

Florianópolis

2008

Dedico este trabalho aos meus pais, Lorene e Valmor, como gratidão por tudo que tem feito por mim, sempre acreditando e apoiando minhas decisões, e apesar da distância, estando ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valmor e Lorene, por permitirem que tudo isso aconteça;

Ao meu irmão Matheus e a toda minha família pelo apoio emocional;

Ao Tiago, pela paciência e amor;

Aos amigos, Anaelka, Daliana, Carlos Tiago, Fábio Penosa, Ítalo, Karla, Mariza, Thiaguinho, Vanessa e Vladimir pelas experiências passadas nestes dois anos;

Aos amigos de laboratório, Amarilis, Andréa, Ariane, Bruno, Chari, Fábio, Gis, Hellen, Ju, Larissa, Paulo, Rafael, Sílvia, Talize e Tati, pelo apoio técnico e companheirismo;

Ao Prof. Dr. Marcos A. S. Silva, pela oportunidade e orientação;

À Prof^a. Dr^a. Simone Cardoso pelos ensinamentos;

À Prof^a. Dr^a. Tania Mari Bellé Bresolin e à Prof^a. Dr^a. Josiane Carvalho Vitorino da UNIVALI, pelo apoio técnico, confiança e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy e à Prof^a. Dr^a. Maria Rovaris pelo auxílio com os animais e análises bioquímicas;

À Farm^a. Darlene Stollmeier do HIJG pela oportunidade;

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Farmácia;

*"Todo grande progresso da ciência resultou de
uma nova audácia da imaginação" (John Dewey)*

RESUMO

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico, muito utilizado em pacientes pediátricos em casos de hipertensão e doenças edematosas, apesar de não haver uma forma farmacêutica líquida disponível comercialmente. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e o controle de qualidade de suspensões farmacêuticas e a avaliação de pacientes pediátricos internados no Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) que fizeram uso da suspensão desenvolvida. Foi realizada a caracterização físico-química da HCTZ e dos polímeros, de acordo com os compêndios oficiais, comprovando a identidade dos mesmos. O teor de HCTZ (matéria-prima) obtido através do método cromatográfico foi $99,8 \% \pm 0,6 \%$ ($n = 6$), confirmando a adequada pureza da amostra. A água utilizada na preparação das formulações foi considerada adequada para uso após a caracterização físico-química e microbiológica. As suspensões contendo 0,4 e 0,6 % de Carboximetilcelulose sódica (F1 e F2) e 0,6 e 0,8 % de Hidroxipropilmetilcelulose (F3 e F4) foram preparadas e analisadas quanto ao potencial zeta, tamanho de partícula, volume de sedimentação e redispersibilidade. Os valores encontrados diferiram dependendo do polímero utilizado, sendo que a formulação F2 apresentou os melhores resultados, com potencial zeta de $-22,6 \pm 1,6$ mV, tamanho de partícula de $44,1 \mu\text{m} \pm 4,9$, volume de sedimentação de $0,11 \text{ mL} \pm 1,8$ após 24 h e tempo de redispersão de $13,3 \text{ s} \pm 2,3$, resultando em partículas floculadas e com sedimento frouxo. O pH das formulações foi corrigido para 3,3, e estas apresentaram-se turvas devido ao material suspenso, com ausência de odores e com sabor ácido característico. Na análise de viscosidade, todas as formulações apresentaram fluxo não-newtoniano pseudoplástico. Para as formulações F1 e F2 o valor de viscosidade aparente a 300 s^{-1} e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ foi de $161,6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 1,5$ e $322 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2,5$, enquanto que para F3 e F4 o valor encontrado foi $230,3 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 0,57$ e $441,6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2,8$, respectivamente. O grau de pseudoplasticidade foi dependente da concentração de polímero utilizada. A metodologia de doseamento por CLAE desenvolvida demonstrou ser específica, linear, exata, precisa e robusta dentro das condições experimentais testadas. A análise quantitativa das formulações F1, F2, F3 e F4 resultou em teores na faixa de 99,8 – 100,7 %. Na caracterização microbiológica, todas as formulações apresentaram contagem de microrganismos viáveis totais $< 10 \text{ UFC/mL}$ e ausência de patógenos. O teste do desafio foi utilizado para avaliar a eficiência do conservante nas formulações F2 e F4. Após 28 dias de teste as suspensões desafiadas apresentaram redução de 90 % de todos os microrganismos patogênicos testados. Os estudos de estabilidade acelerada demonstraram que todas as formulações apresentaram degradação química e queda da viscosidade aparente inicial em valores crescentes com a temperatura. O prazo de validade calculado para as formulações F1, F2, F3 e F4 foi de 190, 188, 185 e 124 dias, respectivamente, armazenadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Para avaliar a ação diurética das suspensões contendo HCTZ em ratos, foram testadas as formulações F2 e F4. As formulações contendo HCTZ e as soluções de controle negativo foram administradas na dose de 10 mg/kg e 10 ml/kg, respectivamente. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e a urina eliminada foi coletada ao final de 8 h. Foi observado um aumento do volume urinário e da excreção de eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^-) nos animais que receberam tratamento em comparação com os grupos controle. A formulação F2 apresentou os melhores resultados com relação à ação diurética em ratos. Esta foi utilizada no ensaio clínico com pacientes pediátricos internados no HIJG, onde foram avaliados o efeito diurético e a pressão arterial. A dose de HCTZ administrada foi dependente da prescrição médica. A evolução tratamento/eficácia foi satisfatória em atingir níveis pressóricos normais em relação à altura, peso, idade e sexo, assim como no aumento da diurese dos pacientes. Assim, a formulação F2 foi a de escolha neste trabalho, devido a sua maior estabilidade e eficácia clínica comprovada.

Unitermos: Hidroclorotiazida, suspensão farmacêutica, controle de qualidade físico-químico e microbiológico, pacientes pediátricos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND QUALITY EVALUATION OF PHARMACEUTICAL SUSPENSIONS CONTAINING HYDROCHLOROTHIAZIDE. EVALUATION OF PEDIATRIC PATIENTS AT PEDIATRIC HOSPITAL JOANA DE GUSMÃO

Hydrochlorothiazide (HCTZ) is a thiazide diuretic used in pediatric patients to treat hypertension and edematous diseases, although there isn't a liquid pharmaceutical form commercially available. By this way, the aim of the present study was to develop and to do the quality control of pharmaceutical suspensions and to evaluate pediatric patients from the Pediatric Hospital Joana de Gusmão (HIJG) that received the suspension. It was carried out the physical-chemical characterization of HCTZ and polymers, in accordance with official literature, which proved their identity. The quantitative assay of HCTZ (raw material) obtained through chromatographic method was $99.8 \% \pm 0.6 \%$ ($n = 6$), which indicates the purity of the sample. The water used to prepare the formulations was considered adequate after physical-chemical and microbiological characterizations. The suspensions containing 0.4 and 0.6 % of CMC-Na (F1 e F2) and 0.6 and 0.8 % of HPMC (F3 e F4) were prepared and analyzed like zeta potential, particle size, sedimentation volume, and redispersibility. The found values showed differences, depending of which polymer was used. The formulation F2 showed the best results, with zeta potential of -22.6 ± 1.6 mV, particle size of $44.1 \mu\text{m} \pm 4.9$, sedimentation volume of $0.11 \text{ mL} \pm 1.8$ after 24 h and redispersion time of $13.3 \text{ s} \pm 2.3$, which resulted in flocculated particles forming a loosely polymer network system. The formulations' pH was corrected to 3.3, and they presented cloudy because of suspense particles, without odors and with characteristic acid flavor. In the viscosity analyze, all the formulations showed pseudoplastic and non-Newtonian behavior. Formulations F1 and F2 presented apparent viscosity (300 s^{-1} e $25 \text{ }^\circ\text{C}$) of $161.6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 1.5$ e $322 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2.5$, while formulations F3 and F4 presented values of $230.3 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 0.57$ e $441.6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2.8$, respectively. The flow behavior index was dependent of polymer concentration. The developed methodology for quantitative assay by CLAE was specific, linear, accurate, precise and robust in tested conditions. The quantitative assay of formulations F1, F2, F3 and F4 resulted in a range of drug content of 99.8 – 100.7 %. In the microbiologic characterization, all the formulations presented number of microorganisms < 10 UFC/mL and absence of pathogenic species. The challenge test was used to evaluate the preservative efficacy in the formulations F2 and F4. After 28 days, the challenged suspensions showed reduction of 90 % of all the pathogenic microorganisms tested. The accelerated stability studies showed that the formulations presented chemical degradation and fall of initial apparent viscosity with increase of temperature. The calculated shelf-life for F1, F2, F3 e F4 was 190, 188, 185 and 124 days, respectively, stored at ambient temperature at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. To evaluate the diuretic action of the HCTZ suspensions in rats, it was tested the formulations F2 and F4. The formulations containing HCTZ and the control solutions were administered to the animals in doses of 10 mg/kg and 10 ml/kg, respectively. The animals were kept in metabolic cages, and the urine was collected at the end of 8 h. It was observed an increase in urinary volume and electrolytes excretion (Na^+ , K^+ , Cl^-) in the animals that received treatment in comparison with control groups. The formulation F2 showed the best diuretic action in rats. This was used at clinical assay with pediatric patients from HIJG, where it was evaluated the diuretic effect and blood pressure. The dose of HCTZ administered was dependent of medical prescription. The evolution of treatment/efficacy was satisfactory, reaching normal pressure levels in relation with height, weight, age and sex, and an increase in patients' diuresis. The formulation F2 was chosen in this study because of it was more stable and its clinical effectiveness was proved.

Key words: Hydrochlorothiazide, pharmaceutical suspension, physical-chemical and microbiological quality control, pediatric patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do Néfron.....	5
Figura 2	Figura esquemática de uma partícula carregada e sua dupla camada elétrica.....	14
Figura 3	Forças de atração e de repulsão entre duas partículas A e B.....	15
Figura 4	Estrutura química da HCTZ.....	39
Figura 5	Espectro de absorção no infravermelho da HCTZ obtido utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr).....	39
Figura 6	Espectro de absorção UV da HCTZ em metanol (10µg/mL).....	40
Figura 7	Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ.....	41
Figura 8	Fotomicrografia de partículas de HCTZ (aumento de 100x).....	41
Figura 9	Curva DSC da HCTZ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	44
Figura 10	Curva TG/DTG da HCTZ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	45
Figura 11	Curvas DSC e TG/DTG da CMC-Na em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	46
Figura 12	Curvas DSC e TG/DTG da HPMC em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.....	46
Figura 13	Fotomicrografias das partículas de HCTZ suspensas (A) F1 (aumento de 400 x); (B) F2 (aumento de 400 x); (C) F3 (aumento de 1000 x); (D) F4 (aumento de 1000 x).....	70
Figura 14	Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ (A) F1; (B) F2.....	71
Figura 15	Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ (A) F3; (B) F4.....	72
Figura 16	Sedimento formado após 24 horas de teste: (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.....	74
Figura 17	Reogramas da viscosidade versus taxa de cisalhamento (0 a 300s ⁻¹ ; 300 a 0s ⁻¹ ; 25 °C) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.....	78
Figura 18	Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio 0,1 M:acetonitrila (70:30 v/v) ajustada a pH 3,0 sob fluxo de 1,3 mL/min e detecção UV a 254 nm. (A) Suspensão de HCTZ (F2) (30 µg/ml); (B) Suspensão placebo.....	81
Figura 19	Cromatogramas obtidos no estudo de stress utilizando fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio 0,1 M:acetonitrila (70:30 v/v) ajustada a pH 3,0 sob fluxo de 1,3 mL/min e detecção UV a 254 nm. (A) HCTZ padrão (30 µg/ml); (B) CTZ padrão (10 µg/ml); (C) Após hidrólise ácida; (D) Após hidrólise básica; (E) Após hidrólise neutra; (F) Após degradação oxidativa.....	83
Figura 20	Curva de calibração média da HCTZ obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.....	84
Figura 21	Viscosidade aparente (300 s ⁻¹ , 25 °C) das formulações F1 e F2 durante o estudo de estabilidade acelerado.....	104
Figura 22	Viscosidade aparente (300 s ⁻¹ , 25 °C) das formulações F3 e F4 durante o estudo de estabilidade acelerado.....	105
Figura 23	Valores de pH obtidos durante o estudo de estabilidade acelerado (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.....	107

Figura 24	Cromatogramas das formulações F1, F2, F3 e F4 obtidos ao final de 180 dias de estudo de estabilidade: (A) F1 a 25 °C; (B) F1 a 40 °C; (C) F2 a 25 °C; (D) F2 a 40 °C; (E) F3 a 25 °C; (F) F3 a 40 °C; (G) F4 a 25 °C; (H) F4 a 40 °C.....	109
Figura 25	Teor residual de HCTZ após 180 dias de estudo de estabilidade nas temperaturas de 4, 25 e 40 °C.....	111
Figura 26	Excreção de Cl ⁻ , K ⁺ e Na ⁺ nos grupos 1 a 6.....	125
Figura 27	Evolução da pressão arterial nos pacientes 1 - 7 após tratamento com suspensão de HCTZ 2,5 mg/mL.....	137
Figura 28	Diurese calculada após tratamento com HCTZ 2,5 mg/mL.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio de identificação.....	33
Tabela 2	Ensaio físico-químico da água purificada.....	35
Tabela 3	Testes de descrição para HCTZ.....	38
Tabela 4	Testes de identificação para HPMC e CMC-Na.....	42
Tabela 5	Análise físico-química da água purificada.....	47
Tabela 6	Composição das formulações (F1, F2, F3 e F4), para suspensão de HCTZ 2,5 mg/mL.....	55
Tabela 7	Metodologia da técnica de contagem de microrganismos viáveis totais..	63
Tabela 8	Potencial zeta das formulações desenvolvidas.....	67
Tabela 9	Diâmetro médio das partículas de HCTZ.....	73
Tabela 10	Volume de sedimentação das suspensões desenvolvidas.....	74
Tabela 11	Ensaio de redispersão das suspensões desenvolvidas.....	76
Tabela 12	Resultados do teste de conformidade do sistema.....	81
Tabela 13	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão.....	85
Tabela 14	Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez.....	86
Tabela 15	Determinação de HCTZ em suspensões farmacêuticas.....	86
Tabela 16	Avaliação da qualidade microbiológica das suspensões.....	87
Tabela 17	Densidade óptica das cepas padrão.....	88
Tabela 18	Contagem de sobreviventes do teste do desafio.....	88
Tabela 19	Equações cinéticas para cálculo da degradação do fármaco.....	102
Tabela 20	Valores de teor residual de HCTZ (%) em suspensões obtidos no estudo de estabilidade acelerado.....	110
Tabela 21	Valores de k e $t_{90\%}$ obtidos utilizando-se as equações de segunda ordem para as temperaturas em estudo.....	112
Tabela 22	Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.....	121
Tabela 23	Estudo comparativo de diversas apresentações de HCTZ no volume urinário.....	123
Tabela 24	Estudo comparativo de diversas apresentações de HCTZ na excreção de eletrólitos.....	124
Tabela 25	Dados dos participantes do estudo.....	136
Tabela 26	Relação de patologias por paciente participante do estudo.....	138

ABREVIATURAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
Av	Agitação vigorosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC-Na	Carboximetilcelulose-sódica
CTZ	Clorotiazida
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
IV	Infravermelho
k	Constante de velocidade
KBr	Brometo de potássio
NMP	Número Mais Provável
PF	Ponto de Fusão
RPM	Rotações por Minuto
t₉₀ %	Tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 %
TG	Termogravimetria
UFC	Unidade Formadora de Colônias
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Introdução Geral e Objetivos.....	01
CAPÍTULO I – Revisão de Literatura	
1 INTRODUÇÃO	05
1.1 DIURÉTICOS – HIDROCLOROTIAZIDA.....	05
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	06
1.3 FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS.....	09
1.3.1 Legislação	11
1.4 SUSPENSÕES FARMACÊUTICAS.....	13
2 REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II – Caracterização Físico-química da Hidroclorotiazida (HCTZ), da Carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) e da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	
1 INTRODUÇÃO	29
2 METODOLOGIA	30
2.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA HCTZ.....	30
2.1.1 Descrição	30
2.1.2 Ensaio de identificação	30
2.1.3 Determinação da perda por dessecação	30
2.1.4 Doseamento	31
2.1.4.1 Reagentes.....	31
2.1.4.2 Instrumental.....	31
2.1.4.3 Preparo das soluções amostra e padrão.....	31
2.1.5 Microscopia	32
2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLÍMEROS.....	32
2.2.1 Ensaio de identificação	32
2.2.2 Perda por dessecação	33
2.3 ESTUDO TERMOANALÍTICO DA HCTZ E DOS POLÍMEROS.....	34
2.3.1 Termogravimetria (TG)	34
2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34
2.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA PURIFICADA.....	35
2.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PURIFICADA.....	35
2.5.1 Contagem de microrganismos viáveis totais	36
2.5.2 Pesquisa de coliformes totais e fecais	36

2.5.2.1	Teste presuntivo.....	36
2.5.2.2	Teste confirmatório para coliformes totais.....	37
2.5.2.3	Teste confirmatório para coliformes fecais (Termorresistentes – <i>E. coli</i>).....	37
2.5.2.4	Expressão dos resultados.....	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA HCTZ.....	38
3.1.1	Descrição	38
3.1.2	Ensaio de identificação	38
3.1.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	38
3.1.2.2	Espectroscopia na região do ultravioleta (UV).....	39
3.1.3	Perda por dessecação	40
3.1.4	Doseamento	40
3.1.5	Microscopia	40
3.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLÍMEROS (CMC-NA E HPMC).....	42
3.2.1	Ensaio de identificação	42
3.2.2	Perda por dessecação	42
3.3	CARACTERIZAÇÃO TERMOANALÍTICA.....	43
3.3.1	HCTZ.....	43
3.3.2	CMC-Na e HPMC.....	45
3.4	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA PURIFICADA.....	47
3.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PURIFICADA.....	47
4	CONCLUSÕES	49
5	REFERÊNCIAS	50

CAPÍTULO III – Preparo e Caracterização de Suspensões contendo Hidroclorotiazida (HCTZ)

1	INTRODUÇÃO	53
2	METODOLOGIA	55
2.1	DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES FARMACÊUTICAS.....	55
2.1.1	Preparo das suspensões.....	55
2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES.....	56
2.2.1	Determinação das características organolépticas	56
2.2.2	Determinação do pH	56
2.2.3	Potencial zeta	56
2.2.4	Tamanho de partícula	57

2.2.5	Volume de sedimentação	57
2.2.6	Redispersibilidade	57
2.2.7	Avaliação do comportamento reológico	58
2.2.8	Doseamento de HCTZ na suspensão	59
2.2.8.1	Condições cromatográficas.....	59
2.2.8.2	Preparo da solução amostra.....	59
2.2.8.3	Preparo da solução padrão.....	60
2.2.8.4	Validação da metodologia.....	60
2.2.8.4.1	Conformidade do sistema	60
2.2.8.4.2	Especificidade	60
2.2.8.4.3	Linearidade, e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	61
2.2.8.4.4	Exatidão	61
2.2.8.4.5	Precisão	62
2.2.8.4.6	Robustez	62
2.2.8.4.7	Análise das suspensões farmacêuticas contendo HCTZ	62
2.3	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS SUSPENSÕES	62
2.3.1	Contagem de microrganismos viáveis totais	62
2.3.2	Pesquisa de patógenos específicos	63
2.3.3	Teste do desafio	64
2.3.3.1	Padronização das cepas.....	64
2.3.3.2	Procedimento do teste.....	65
2.3.3.3	Critério de aceitação.....	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES	66
3.1.1	Determinação das características organolépticas	66
3.1.2	Determinação do pH	66
3.1.3	Potencial zeta	66
3.1.4	Tamanho de partícula	69
3.1.5	Volume de sedimentação e Redispersibilidade	73
3.1.6	Avaliação do comportamento reológico	76
3.1.7	Doseamento de HCTZ na suspensão	80
3.1.7.1	Desenvolvimento do método.....	80
3.1.7.2	Validação do método.....	81
3.1.7.2.1	Especificidade	81
3.1.7.2.2	Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	84
3.1.7.2.3	Exatidão e Precisão	84

3.1.7.2.4	Robustez	85
3.1.7.2.5	Análise da suspensão de HCTZ	86
3.2	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS SUSPENSÕES	87
3.2.1	Contagem de microrganismos viáveis totais e pesquisa de patógenos	87
3.2.2	Teste do desafio	87
4	CONCLUSÕES	90
5	REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO IV – Estabilidade Físico-química de Suspensão de Hidroclorotiazida (HCTZ)

1	INTRODUÇÃO	98
2	METODOLOGIA	101
2.1	ESTABILIDADE FÍSICA	102
2.1.1	Características organolépticas	101
2.1.2	Avaliação do comportamento reológico	101
2.2	ESTABILIDADE QUÍMICA	101
2.2.1	Determinação do pH	101
2.2.2	Avaliação da termoestabilidade	101
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.1	ESTABILIDADE FÍSICA	103
3.1.1	Características organolépticas	103
3.1.2	Avaliação do comportamento reológico	103
3.2	ESTABILIDADE QUÍMICA	106
3.2.1	Determinação do pH	106
3.2.2	Avaliação da termoestabilidade	108
4	CONCLUSÕES	114
5	REFERÊNCIAS	115

CAPÍTULO V – Avaliação da Ação Diurética de Suspensões de Hidroclorotiazida (HCTZ) em Ratos

1	INTRODUÇÃO	118
2	METODOLOGIA	120
2.1	ANIMAIS	120
2.2	AÇÃO DIURÉTICA	120
2.2.1	Determinação de eletrólitos	122
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	123

4	CONCLUSÕES	126
5	REFERÊNCIAS	127

CAPÍTULO VI – Ensaio Clínico com Pacientes Pediátricos do Hospital Infantil Joana de Gusmão

1	INTRODUÇÃO	129
1.1	LEGISLAÇÃO.....	129
1.2	FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS ANTI-HIPERTENSIVAS.....	130
2	METODOLOGIA	132
2.1	DESENHO DO ESTUDO.....	132
2.2	QUESTÕES DE ORDEM ÉTICA.....	132
2.2.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	132
2.3	CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DA PESQUISA.....	133
2.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	133
2.5	TAMANHO DA AMOSTRA.....	133
2.6	VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	133
2.7	TRATAMENTO DOS SUJEITOS.....	134
2.8	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	134
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
4	CONCLUSÕES	139
5	REFERÊNCIAS	140
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
	ANEXOS	145
	1. Parecer do comitê de ética no uso de animais (CEUA).....	146
	2. Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	148
	3. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	150
	4. Publicação no periódico Chromatographia.....	152

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

Considerada ao mesmo tempo, uma doença e um fator de risco, a hipertensão arterial representa um dos maiores desafios em saúde pública, particularmente pela complexidade dos recursos necessários para seu controle como doença (WHO, 2007). A hipertensão arterial na infância está associada com uma incidência maior de causas secundárias do que nos adultos; entretanto, na última década, os estudos têm mostrado um aumento da incidência de hipertensão essencial na população pediátrica (LIMA, 2004).

O desenvolvimento de medicamentos apropriados para crianças é um desafio devido a vários fatores, entre eles o alto custo da pesquisa, o mercado restrito e o dilema ético de envolver crianças em estudos farmacocinéticos. Devido à falta de dados suficientes, aproximadamente 80 % de todos os medicamentos disponíveis comercialmente não são próprios para crianças (OSUNTOKUN, 2006).

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico largamente utilizado para o tratamento de hipertensão arterial em crianças, entretanto, não possui uma forma farmacêutica pediátrica. Está disponível comercialmente no Brasil na forma de comprimidos de 25 e 50 mg, ou associada a outros fármacos anti-hipertensivos, não existindo nenhuma forma farmacêutica líquida (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2007).

Sendo assim, o pediatra orienta aos pais realizarem a quebra dos comprimidos e/ou a abertura de cápsulas, para facilitar a deglutição, e o farmacêutico a triturar o pó e suspender em veículo apropriado. Estes procedimentos, se não realizados corretamente, podem levar a erros na dosagem, além de problemas na estabilidade, biodisponibilidade e absorção do fármaco (FLYNN, 2002).

Para contornar o problema, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica líquida é desejável. Como a HCTZ é insolúvel água, a forma farmacêutica mais adequada é a suspensão. O desenvolvimento de uma suspensão é uma etapa crítica devido a enorme gama de parâmetros para análise, além da instabilidade da HCTZ em água, o que pode comprometer a estabilidade da formulação (MOLLICA et al., 1971). Por isso, o controle de qualidade físico químico e microbiológico é de fundamental importância para a estabilidade da formulação final, e conseqüentemente, para a eficácia do tratamento.

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma suspensão oral de HCTZ para uso pediátrico no Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG).

Como objetivos específicos o estudo apresentou:

- Caracterização físico-química do fármaco (HCTZ) quanto ao seu teor de princípio ativo, teor de umidade, comportamento termoanalítico e tamanho de partícula, assim como ensaios de identificação;
- Caracterização físico-química dos polímeros carboximetilcelulose sódica (CMC-Na) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) quanto aos ensaios de identificação, teor de umidade e comportamento termoanalítico;
- Análise físico-química e microbiológica da água destilada;
- Preparo e caracterização físico-química de suspensões de HCTZ quanto às características organolépticas, pH, viscosidade, potencial zeta, tamanho de partícula, redispersibilidade, volume de sedimentação e teor de princípio ativo, bem como caracterização microbiológica e eficiência do conservante;
- Estudo de estabilidade físico-química das formulações desenvolvidas e determinação do prazo de validade;
- Avaliação do efeito diurético do fármaco em ratos através da determinação do volume urinário e excreção de eletrólitos;
- Ensaio clínico com pacientes pediátricos internados no HIJG e avaliação da eficácia da formulação através da determinação da diurese e pressão arterial.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diuréticos - Hidroclorotiazida

Os diuréticos são substâncias que aumentam o fluxo urinário. Determinam, ao nível de néfron, redução da capacidade tubular de reabsorção de sódio e água e, em algumas circunstâncias, incremento da taxa de filtração glomerular (RANG; DALE; RITTER, 2007). Possuem amplas indicações no tratamento de doenças edematosas e não-edematosas. No primeiro grupo encontra-se o edema renal, hepático e cardíaco. Como doenças não-edematosas classificam-se a hipertensão arterial sistêmica, hipercalcemia e diabetes insípido nefrogênico (GOODMAN et al., 2003).

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico que atua sobre a parte inicial do túbulo distal do néfron, através de sua ligação ao sítio do cloreto do sistema de co-transporte Na^+/Cl^- eletroneuro, inibindo sua ação diminuindo a reabsorção ativa de sódio e do cloreto que o acompanha (figura 1) (RANG; DALE; RITTER, 2007).

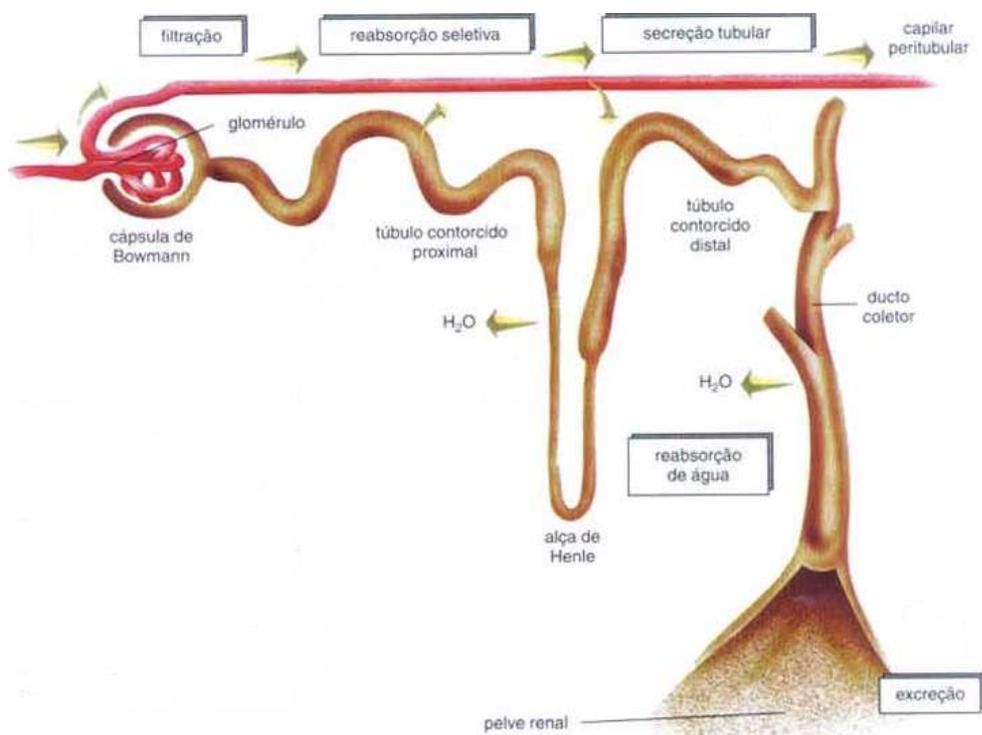


Figura 1. Estrutura do Nefron

Fonte: <http://www.ocorpohumano.com.br/>

É eficaz por via oral, sendo bem absorvida pelo trato gastrointestinal e excretada na urina por secreção tubular. O início de ação é observado em 2 horas, com efeito máximo em cerca de 4-6 horas e duração entre 8 e 12 horas. A perda de potássio é significativa e pode

ser grave. A excreção de ácido úrico e de cálcio encontra-se diminuída, enquanto a de magnésio aumenta (RANG; DALE; RITTER, 2007). Quando utilizada no tratamento da hipertensão, a queda inicial observada na pressão arterial é devida a uma redução do volume sangüíneo em consequência da diurese, entretanto, a fase subsequente parece ser devida a uma ação direta sobre os vasos sangüíneos (SILVA, 2006).

Os principais efeitos adversos da HCTZ resultam de algumas de suas ações renais, sendo a redução de potássio plasmático particularmente significativa, o que pode induzir arritmias ventriculares. Outros efeitos indesejáveis incluem alcalose metabólica, aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico e hiperglicemia. O emprego de baixas doses diminui o risco de efeitos adversos, sem prejuízo da eficácia anti-hipertensiva (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO ARTERIAL, 2006; SWEETMAN, 2007). Os diuréticos também podem provocar intolerância à glicose, além de promover aumento da trigliceridemia, em geral dependente da dose. Trata-se de um evento transitório e de importância clínica ainda não-comprovada (GROSSMAN e MESSERLI, 2006).

No Brasil a HCTZ está disponível no mercado na forma de comprimidos de 25 e 50 mg, ou associada a outros fármacos anti-hipertensivos, não existindo nenhuma forma farmacêutica líquida (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2007). Nos Estados Unidos o medicamento na forma de solução oral é fornecido por apenas um laboratório farmacêutico na dose de 50mg/5mL (FDA, 2007).

1.2 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial, uma entidade clínica multifatorial, é conceituada como uma síndrome caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados associados a alterações metabólicas, hormonais e a fenômenos tróficos (hipertrofia cardíaca e vascular) (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO ARTERIAL, 2006).

A hipertensão arterial essencial é a doença crônica que apresenta maior prevalência no mundo. Analisando-se os dados de um estudo com diversos países verifica-se que a prevalência de hipertensão é maior na Europa (44,2 %) quando comparada com a América do Norte (27,6 %) (WOLF-MAYER et al., 2007). No Brasil, 33 % da população adulta e 1 a 11 % da população pediátrica pode ser rotulada como hipertensa (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO ARTERIAL, 2006; REZENDE et al., 2003). Esta variação na prevalência de hipertensão arterial em crianças e adolescentes depende

da metodologia empregada (critérios de normalidade adotados, faixa etária, número de medidas por visita e tempo de acompanhamento). As taxas mais elevadas de prevalência são encontradas em estudos baseados em visita única, onde pode ocorrer a chamada hipertensão do avental branco, caracterizada por níveis pressóricos compatíveis com hipertensão na aferição de consultório e normotensão na aferição residencial. Quando a pressão arterial é aferida repetidas vezes, como o recomendado para o diagnóstico de hipertensão arterial, a prevalência tende a cair por causa do fenômeno de regressão à média e por que a criança se acostuma com o procedimento e fica mais tranqüila. Então, a prevalência atual de hipertensão arterial na infância cai significativamente para próximo de 1 % (LANDE e FLYNN, 2007; SALGADO e CARVALHAES, 2003).

Nos adultos, a doença é o segundo principal fator de risco para as cardiopatias e o primeiro para acidente vascular cerebral, além de importante causa de insuficiência renal crônica terminal. Existem vários indícios de que a hipertensão arterial essencial do adulto tem sua história natural iniciada na infância (CROMWELL; MUNN; ZOLKOWSKI-WYNNE, 2005). Crianças com pressão arterial acima do percentil 90 têm um risco 2,4 vezes maior de tornarem-se adultos hipertensos. Apesar da hipertensão essencial em crianças não se apresentar como fator de risco para eventos cardiovasculares na infância, podem ser observadas alterações cardiovasculares e hemodinâmicas nesses indivíduos a partir da segunda década de vida ou mesmo mais precocemente (GARCIA et al., 2006).

Nas últimas décadas, as referências mais freqüentemente adotadas na prática clínica foram os Relatórios da Força Tarefa (*Task Force*), indicados pelo *National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI)* e pela Academia Americana de Pediatria, onde podem ser encontradas informações de estudos abrangendo crianças e adolescentes. Os relatórios contêm tabelas normativas com altura, idade e sexo, para o diagnóstico de hipertensão arterial da criança e adolescente. Esses critérios consideram ainda, para todas as idades, o quinto som de *Korotkoff* (desaparecimento dos sons) como marco referencial para especificar a pressão diastólica, adotando as normas da Academia Americana de Cardiologia. É importante salientar que nas crianças pequenas esse quinto som pode não ocorrer, ouvindo-se então os batimentos até o completo desinsuflar do manguito (nível zero). Nesse caso não existe hipertensão diastólica. Por isto, em crianças menores de um ano, utiliza-se a pressão arterial sistólica para definir hipertensão. Na primeira semana de vida caracteriza hipertensão a pressão sistólica ≥ 96 mmHg e hipertensão grave a medida ≥ 106 mmHg. Nas crianças entre 8 e 30 dias de vida, hipertensão é definida através da pressão sistólica ≥ 104 mmHg e hipertensão grave se ≥ 110 mmHg (NHBPEP 2005; SANTOS et al., 2003).

Desta forma, definiu-se a hipertensão arterial como a pressão sangüínea igual ou acima do percentil 95 para a respectiva idade, sexo e altura, fazendo os ajustes para peso, medida em pelo menos três ocasiões diferentes (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006; NHBPEP, 2005; SALGADO e CARVALHAES, 2003; SANTOS et al., 2003; VOGT, 2001).

A hipertensão arterial geralmente é secundária na criança abaixo dos dez anos - representa 90 % dos casos, sendo na maioria das vezes devido à doença renal. Entretanto, na última década, os estudos têm mostrado um aumento da incidência de hipertensão essencial na população pediátrica, principalmente na adolescência. O fator mais importante implicado na gênese da hipertensão essencial na infância é a obesidade, que está se tornando um problema epidêmico (LIMA, 2004).

A hipertensão arterial essencial predomina acima dos dez anos, com níveis pressóricos não muito elevados, no percentil 95 ou discretamente acima dele. A concomitância de vários familiares hipertensos, sem causa determinada, levou à formulação da hipótese genética para este grupo. Também observou-se que crianças nascidas com estatura abaixo da média, e com reduzido ganho de peso e altura no primeiro ano de vida, têm maior probabilidade de tornarem-se adultos hipertensos. Outros fatores como dieta rica em sódio desde o período neonatal, estado emocional desfavorável e nível socioeconômico estão relacionados à hipertensão arterial sistêmica (SANTOS et al., 2003, REZENDE et al., 2003).

Na ampla maioria dos pacientes o diagnóstico decorre da aferição da pressão arterial nas crianças e adolescentes, sendo obrigatória a partir de três anos de idade. Além da avaliação habitual em consultório, recomenda-se a aferição rotineira da pressão arterial no ambiente escolar (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

O tratamento não-farmacológico é obrigatório a partir do percentil 90 de pressão sistólica/diastólica, com ênfase para a adoção de medidas em âmbito familiar, em especial a correção do excesso de peso (FALKNER e DANIELS, 2004; WELLS e STOWE, 2001).

Ainda permanece incerto qual a idade ou o momento apropriado para o início do tratamento farmacológico em pacientes pediátricos com hipertensão arterial (SALGADO e CARVALHAES, 2003). Como regra geral, o emprego de anti-hipertensivos deve ser considerado nos que não respondem ao tratamento não-medicamentoso, naqueles com evidência de lesão em órgãos-alvo ou fatores de risco conhecidos, como diabetes e

dislipidemia, e na hipertensão sintomática ou hipertensão secundária. O objetivo do tratamento é atingir valores de pressão arterial sistólica e diastólica abaixo do percentil 95 para sexo, altura e faixa etária na hipertensão arterial não complicada, e abaixo do percentil 90 na hipertensão complicada por comorbidades. Não há estudos de longo prazo sobre o uso anti-hipertensivo na infância ou na adolescência, sendo assim, a escolha dos fármacos obedece aos critérios utilizados para adultos (CROMWELL; MUNN; ZOLKOWSKI-WYNNE, 2005; V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

Podem ser utilizadas associações de medicamentos no tratamento da hipertensão, entretanto, para o tratamento da população pediátrica é recomendada a utilização de um único fármaco, aumentando a dose até o máximo permitido, antes de considerar a associação de outro fármaco (WELLS e STOWE, 2001).

Os diuréticos são amplamente utilizados, como monoterapia inicial, na hipertensão arterial sistêmica leve ou moderada, especialmente em negros, idosos, obesos e hipervolêmicos. Têm capacidade de, isoladamente, normalizar as cifras tensionais de aproximadamente 70 % dos portadores de hipertensão arterial leve ou moderada (KATZUNG, 2006).

1.3 Formulações Pediátricas

Um dos maiores problemas quando se fala em formulações pediátricas é a falta de adequação das especialidades farmacêuticas a este grupo, quer com relação à formulação, dosagem, forma farmacêutica, osmolalidade, vias de administração ou excipientes utilizados, quer, ainda, com relação às características biofarmacêuticas de eficácia e de segurança (PETERLINI; CHAUD; PEDREIRA, 2003; RAMA et al., 2005). Um exemplo desse desconhecimento do problema, foi a morte de 4 crianças, com menos de 3 anos em 2006, após terem se asfixiado tentando engolir comprimidos de albendazol, durante uma campanha contra parasitoses infantis na Etiópia (WHO, 2007). Para evitar casos como esse, o pediatra geralmente orienta aos pais realizarem a quebra dos comprimidos para facilitar a deglutição, o que pode causar erros na dosagem, além de problemas na estabilidade, biodisponibilidade e absorção do fármaco (RAMA et al., 2005; STANDING e TULEU, 2005).

Um alerta publicado em 1997, pelo *National Institute of Child Health and Human Development*, dos Estados Unidos da América, informava que, apenas cinco dos 80

fármacos mais utilizadas em recém-nascidos e lactentes eram aprovadas para uso pediátrico. Outro estudo realizado na Holanda, entre crianças hospitalizadas, mostrou que 92 % dos pacientes receberam um ou mais medicamentos não aprovados (JONG; VULTO; HOOG, 2000).

A falta de conhecimento das diferenças existentes entre adultos e crianças teve conseqüências trágicas no passado. A maioria delas ocorreu no período neonatal, como por exemplo, o tratamento com sulfonamidas causando lesão cerebral em mais de 100 crianças, o cloranfenicol causando a síndrome do bebê cinzento (colapso cardiovascular), e a talidomida, que levou ao nascimento de crianças com deformações congênitas (RAKHMANINA e ANKER, 2006; WARD et al., 2006).

Atualmente observa-se que apenas alguns fármacos anti-hipertensivos foram testados especificamente em crianças. A nifedipina foi o primeiro fármaco a ser largamente utilizado em crianças, principalmente por sua ação rápida. O enalapril foi o primeiro Inibidor da ECA a receber a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em crianças hipertensas. Outros medicamentos, como ramipril, já se mostraram eficazes e estão em fase de estudo para liberação. A HCTZ é frequentemente utilizada em crianças na dose de 1 – 3 mg/kg a cada 12 horas (SALGADO e CARVALHAES, 2003).

Peculiaridades fisiológicas se modificam ao longo do tempo, o que torna as crianças mais susceptíveis aos efeitos nocivos dos medicamentos, recomendando uma atenção específica dos estudos de farmacovigilância. No entanto, Impicciatore e colaboradores (2001) revisando a literatura médica publicada entre 1966 e 2000, identificaram apenas 21 estudos prospectivos sobre incidência de reações adversas a medicamentos em pediatria. A partir de 17 trabalhos selecionados para a análise estatística os autores calcularam em 9,53 % a incidência geral de reações adversas em crianças hospitalizadas e em 1,46 % naquelas atendidas em ambulatório. Verificou-se uma maior freqüência de reações adversas ao uso de medicamentos não licenciados para uso pediátrico (*unlicensed*) bem como ao emprego de produtos de maneira diversa das especificações autorizadas no registro (*off label*), sendo esta uma prática com elevado risco de segurança e de eficácia, na ausência de informação acerca da estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade do medicamento (CARVALHO et al., 2003; SANTOS et al., 2003).

O mais agravante da situação é que os efeitos adversos, em pediatria, são realmente relatados em menos de 10 % dos casos, visto que, principalmente em países

pouco desenvolvidos, não existem estratégias seguras de vigilância farmacêutica e sanitária (WHO, 2007).

A terapêutica farmacológica confronta-se, por um lado, com um organismo sujeito a marcadas alterações biológicas, resultantes da composição orgânica e da maturação funcional, que decorre de diferentes graus em crianças com a mesma idade, determinando modificações nos perfis farmacocinético e farmacodinâmico e, por outro lado, com a necessidade efetiva da utilização de fármacos (RAKHMANINA e ANKER, 2006; WARD et al., 2006).

Cria-se um verdadeiro dilema para o prescritor, pois não prescrevê-los pode significar privar os pacientes pediátricos de benefício terapêutico potencial, enquanto que extrapolar à estes as informações que levaram à aprovação dos medicamentos para uso em adultos, poderia expor a criança a risco desconhecido. Geralmente, o cálculo da dose é feito de acordo com a área de superfície corpórea, o peso e a idade da criança, entretanto, estas fórmulas nem sempre se mostram adequadas e confiáveis (ELIAS; ANTONIALI; MARIANO, 2005; LACK e STUART-TAYLOR, 1997). Igualmente, os profissionais que trabalham na área, também se encontram desamparados, pois necessitam saber como utilizar, diluir, estocar e administrar os medicamentos, muitas vezes sem o respaldo de evidências científicas, o que leva à constatação de diferentes práticas realizadas em serviços de atendimento pediátrico e até mesmo em diferentes setores de um mesmo hospital (PETERLINI et al., 2003). Deve ser conciliada a observação clínica rigorosa, feita pelo médico, e a disponibilização de informações sobre medicamentos em pediatria, feita pelo farmacêutico (MEINERS e BERGSTEN-MENDES, 2002).

A estratégia de promoção de segurança de medicamentos para crianças, feita pela *World Health Organization* através do programa *Make Medicines Child Size*, apresenta uma série de recomendações para que medidas de controle sejam instaladas, em todos os países. Uma dessas orientações é o emprego de sistemas de vigilância e o apoio ao desenvolvimento de pesquisas, voltadas para o desenvolvimento de técnicas mais apropriadas de produção de medicamentos infantis (WHO, 2007).

1.3.1 Legislação

Por motivos legais, éticos e econômicos, pacientes pediátricos são geralmente excluídos de ensaios clínicos para desenvolvimento de novos medicamentos, sendo chamados de “órfãos terapêuticos” (SHIRKEY, 1999).

As justificativas mais comumente relatadas para a falta de resultados de estudos pediátricos para a aprovação de novos medicamentos ou para novas indicações pediátricas de medicamentos já existentes no mercado têm sido o excessivo custo dos estudos comparados ao tamanho do mercado potencial entre pacientes pediátricos; a dificuldade de encontrar número suficiente de pacientes; o longo tempo que um estudo pediátrico pode levar, a complexidade dos aspectos éticos; e a escassez de investigadores farmacológicos pediátricos qualificados (MEINERS e BERGSTEN-MENDES, 2001; OSUNTOKUN, 2006).

Nos Estados Unidos, o FDA regula a produção, aprovação e promoção dos medicamentos, não o uso deles pelos médicos. Novos usos, doses, indicações não são aprovados pelo FDA até que seja obtida evidência substancial de segurança e efetividade para uma dada indicação ou grupo etário (FDA, 2007).

O número de fármacos estudados sistematicamente em crianças aumentou nos últimos anos, graças ao incentivo fornecido às indústrias farmacêuticas através do *Food and Drug Administration Act* (FDAA) e do *Best Pharmaceutical for Children Act* (BPCA). De acordo com estes guias as indústrias farmacêuticas que realizarem estudos na população pediátrica recebem 6 meses de exclusividade no mercado. Como consequência negativa está a falta de dados pediátricos confiáveis para medicamentos mais antigos que não estão mais sob patente. Por outro lado, novos resultados de ensaios clínicos podem fornecer dados que combinados com recomendações primárias baseadas em opiniões de especialistas e experiências clínicas podem guiar o uso destes medicamentos (NHBPEP, 2005).

Na União Européia a legislação 1902/2006 entrou em vigor em janeiro de 2007 objetivando reforçar a segurança de medicamentos pediátricos aumentando a investigação, o desenvolvimento e a autorização do uso de medicamentos em crianças baseado na experiência clínica, evitando expor a criança a ensaios desnecessários (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

A *International Conference on Harmonization* (ICH) publicou um guia para investigação clínica de medicamentos na população pediátrica. O guia contém informações sobre quando iniciar um estudo, tipos de estudos realizados, categorias de idade e princípios éticos. Os estudos farmacocinéticos devem ser realizados nos pacientes pediátricos doentes, o que pode levar a uma variabilidade maior nos dados, quando comparados com estudos em adultos sadios, porém, estes refletem melhor o uso clínico do medicamento (ICH, 2000).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão vinculado ao Ministério da Saúde, autoriza o registro de medicamentos no território nacional, baseado em dados e informações de agências reguladoras de reconhecimento internacional (BRASIL, 2007).

1.4 Suspensões Farmacêuticas

Uma suspensão é uma dispersão grosseira na qual partículas insolúveis, geralmente maiores que 1 µm de diâmetro, encontram-se dispersas em um meio líquido, usualmente aquoso (AULTON, 2005; JATO, 2001; USP, 2007). A fase externa, contínua ou dispersante, é líquida ou semi-sólida e a dispersa, interna ou descontínua, constituída por partículas discretas ou por uma rede de partículas, resultado de interações entre as mesmas (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

A absorção de um fármaco a partir desse tipo de forma farmacêutica é limitada pela velocidade de dissolução. A administração de uma suspensão aquosa pela via oral significa colocar em contato imediato com os fluidos intestinais uma superfície muito grande de fármaco disperso. Isso favorece a dissolução e, conseqüentemente, a absorção do fármaco (AULTON, 2005).

As suspensões constituem um importante grupo de formas farmacêuticas, sendo assim, apresentam muitos desafios do ponto de vista de formulação e estabilidade físico-química (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Existem várias razões para se preparar uma suspensão oral. Uma delas é que certas substâncias são quimicamente instáveis em solução, porém estáveis em suspensão. Além disso, para pacientes pediátricos a forma líquida é preferível à sólida pela maior facilidade de deglutição e pela flexibilidade da administração de diferentes doses (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; YOKOI, 2005).

As principais propriedades físicas desejáveis numa suspensão farmacêutica são que ela sedimente lentamente, e volte a se dispersar com agitação suave do recipiente, o tamanho das partículas dispersas deve permanecer constante por longos períodos de repouso e a suspensão não deve ser muito viscosa para poder ser facilmente removida do recipiente (AULTON, 2005; GALLARDO et al., 2005; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; PAWLIK et al., 2005; SINGH et al., 2005; TKACHENKOa,b et al., 2006). Por outro lado, a avaliação microbiológica é de fundamental importância no controle de qualidade de uma suspensão, visto a elevada quantidade de água presente na formulação (USP, 2007).

Uma característica importante a ser levada em conta no preparo de uma suspensão é a molhabilidade do pó, que é definida como a troca de uma interface sólido-ar por uma sólido-líquido (ANSEL et al., 2000). Em suspensões as partículas sólidas hidrófobas apresentam tendência a flutuar na superfície do líquido devido ao elevado ângulo de contato sólido-líquido, que depende da tensão interfacial e das tensões superficiais do sólido e do líquido. Desta forma, a incorporação de um agente molhante, como a glicerina, diminui este ângulo de contato entre a superfície sólida e o líquido, aumentando a dispersibilidade do pó (ANSEL et al., 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). Além disto, a glicerina utilizada com soluções poliméricas pode aumentar a viscosidade do meio através de pontes de hidrogênio, formando macromoléculas (YANG e ZHU, 2007).

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

A carga da superfície influencia a distribuição espacial dos íons próximos à superfície, atraindo íons de carga oposta (contra-íons) e repelindo íons de mesma carga (co-íons). Este efeito somado aos efeitos de movimento térmico, leva à formação da dupla camada elétrica, que consiste de uma superfície carregada e de um excesso neutralizante de contra-íons sobre co-íons distribuídos de maneira difusa no meio aquoso (figura 2) (AULTON, 2005; NETZ e ORTEGA, 2002).

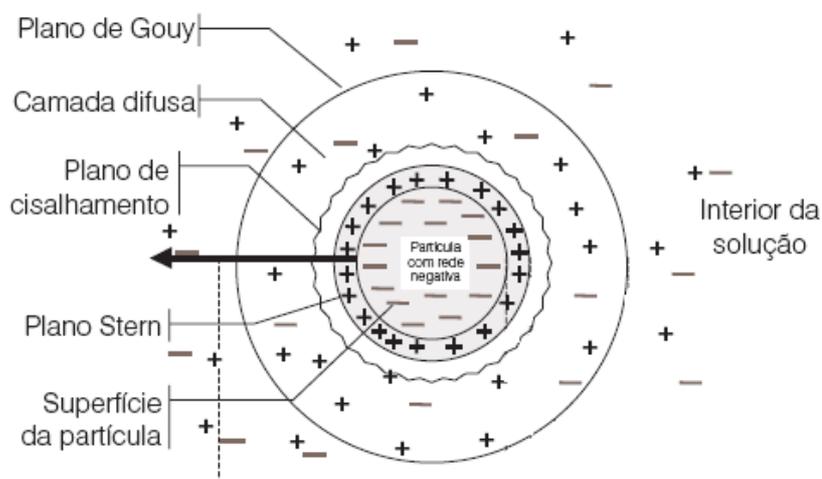


Figura 2. Figura esquemática de uma partícula carregada e sua dupla camada elétrica. Fonte: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc09/quimsoc.pdf>

Há cinco possíveis tipos de forças entre as partículas: (I) forças eletrostáticas de repulsão; (II) forças de Van der Waals ou forças eletromagnéticas de atração; (III) forças de Born - de pequeno alcance e repulsivas; (VI) forças estéricas repulsivas ou atrativas de cadeias de polímeros adsorvidos nas partículas; e (V) interação hidrofóbica (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

As considerações das forças eletrostáticas de repulsão e das forças de atração de *Van der Waals* feita pelos russos Deryagin e Landau e pelos cientistas alemães Verwey e Overbeek resultaram na Teoria DLVO, onde a combinação da energia eletrostática repulsiva com a energia potencial de atração proporciona uma energia total de interação (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; NETZ e ORTEGA, 2002; PHENRAT et al., 2007).

A consideração da curva da energia potencial total de interação versus a distância entre as partículas (figura 3), mostra que a atração predomina a pequenas distâncias, onde localiza-se o mínimo primário. A atração a grandes distâncias entre as partículas que produz o mínimo secundário provém da queda da energia repulsiva com a distância de modo mais rápido do que a da energia atrativa. A distâncias intermediárias, a repulsão da dupla camada pode predominar, produzindo um máximo primário na curva e as partículas apresentam pequena tendência à agregação. A adição de um eletrólito que comprime a dupla camada e reduz o potencial zeta, vai baixar o máximo primário e aumentar a profundidade do mínimo secundário, ocorrendo a floculação das partículas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; GALLARDO et al., 2005; GUNGOR, et al., 2001; YOKOI, 2005). Como se observa na figura, a interação resultante apresenta duas regiões mínimas de atração, uma primária e a outra secundária. O mínimo secundário atrativo está diretamente relacionado com o potencial zeta.

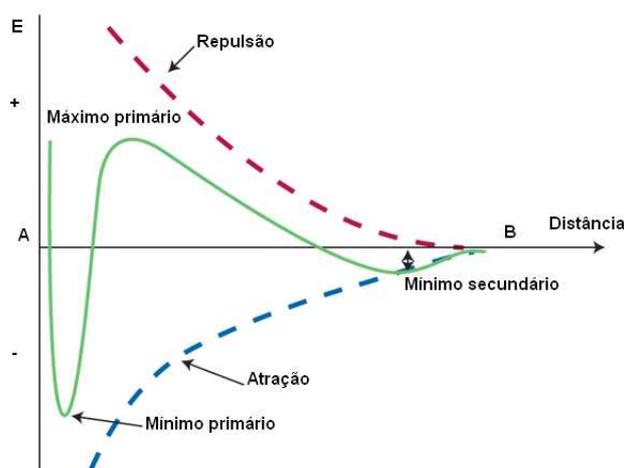


Figura 3. Forças de atração e de repulsão entre duas partículas A e B.
Fonte: www.depts.washington.edu

Em um campo elétrico, como em eletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta (CAI; ODE; MURAKAMI, 2006; GUNGOR et al., 2001). A magnitude do potencial zeta é a medida indireta da carga das partículas, e este valor determina a extensão das forças eletrostáticas de repulsão entre partículas carregadas, demonstrando a relação entre a adsorção de aditivos na superfície do fármaco e a estabilidade da suspensão (DURO et al., 1998; HARIF e ADIN, 2007; TKACHENKO et al., 2006; YOKOI, 2005).

Desta forma, quando as forças repulsivas predominam as partículas permanecem como unidades separadas e a sedimentação é lenta, podendo levar ao fenômeno de *caking*, onde o sedimento formado é compacto e difícil de redispersar, sendo este sistema defloculado. Por outro lado, em um sistema floculado a agregação das partículas por forças de ligação fracas de *Van der Waals* conduzirá a uma sedimentação mais rápida onde o sedimento é poroso, volumoso e fácil de redispersar, com menor tendência a compactação (GALLARDO et al., 2005).

A técnica de floculação controlada é baseada na teoria DLVO, através do princípio de que as forças repulsivas entre as partículas, devido ao potencial zeta, podem ser reduzidas pela adição de um íon de carga oposta. Isto permite uma redispersão adequada quando necessário e com uma viscosidade ajustada de modo que a velocidade de sedimentação seja a mínima possível, sendo alcançado mediante a inclusão de eletrólitos, tensoativos ou polímeros solúveis em água (AULTON, 2005).

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como agentes floculantes, molhantes e para garantir uma viscosidade adequada (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; KAMIBAYASHI; OGURA; OTSUBO, 2005; KIBBE, 2000; YASUEDA, 2004). A capacidade de estabilização da suspensão pelo polímero depende da extensão da sua adsorção pela partícula, da estrutura química do polímero, da sua solubilidade, da natureza das interações com a água e da concentração utilizada (DURO et al., 1998; TERAYAMA et al., 2004). Polímeros com características iônicas induzem interações eletrostáticas e estéricas na superfície das partículas, formando um complexo partícula-polímero com o polímero emergindo na fase aquosa (CAI; ODE; MURAKAMI, 2006; GUNGOR et al., 2001). Esta parte livre irá se unir a outra partícula formando uma ponte e assim, promover a floculação (BARANY e SZEPESSZENTGYORGYI, 2004; DURO et al., 1998).

Por outro lado, materiais poliméricos não-iônicos adsorvidos na superfície das partículas podem estabilizar a suspensão mesmo na ausência de um potencial zeta significativo. A aproximação de duas partículas com camadas poliméricas adsorvidas resulta em uma interação estérica quando as camadas se sobrepõem, levando à repulsão (GUNGOR et al., 2001; YASUEDA, 2004). Contudo, para produzir um sistema floculado é necessário um balanço entre as forças atrativas e repulsivas, para evitar a aproximação de partículas não revestidas, mas também para levar à agregação a cerca do dobro da espessura da camada adsorvida. Este balanço das forças depende da espessura e da concentração do polímero na camada adsorvida (AULTON, 2005).

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

A HPMC é um polímero não-iônico solúvel em água, diminui a tensão superficial, formando uma solução coloidal viscosa estável em pH de 3 a 11 e inibe a cristalização de fármacos causada por variações na temperatura (RAGHAVAN et al., 2003; YASUEDA et al., 2004). A redução da tensão superficial é devido a um aumento do número de segmentos do polímero adsorvidos na interface do meio, causado por uma mudança da conformação molecular das macromoléculas em solução (ARBOLEYA e WILDE, 2005). Além disto, a HPMC pode formar agregados em consequência de seus grupos metila, através de interações hidrofóbicas na interface das partículas (PEREZ, 2008). Este polímero produz soluções claras, com menos fibras não dispersas, sendo preferível para uso em formulações de uso oftálmico. Apresenta incompatibilidades com sais metálicos e íons orgânicos devido ao seu caráter não-iônico (KIBBE, 2000).

A CMC-Na é um polieletrólito aniônico utilizada em soluções orais na faixa de 0,1 a 1%, produzindo soluções claras, tanto em água quente quanto em fria e mantendo-se estável em pH de 2 a 10 (AULTON, 2005; KIBBE, 2000). A sua principal característica é que possui alta viscosidade em baixas concentrações (YANG e ZHU, 2007). É formada quando o ácido cloroacético ou seu sal sódico reage com celulose alcalina. É um copolímero com duas unidades: β -D-glucose e β -D-glucopiranosose-2-O-(carboximetil)-sal-monossódico, conectado via ligações β -1,4-glicosídico. A cadeia conformacional da CMC-Na em solução

apresenta conformação helicoidal, o que influencia no seu comportamento reológico (CANCELA et al., 2005; YASAR et al., 2007). Pode ionizar em solução aquosa, podendo agir simultaneamente por meio de efeitos eletrostáticos e estéricos. Apresenta incompatibilidade com soluções fortemente ácidas e sais de ferro, alumínio, mercúrio e zinco (AULTON, 2005; FALKIEWICZ, 1996; KIBBE, 2000).

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

A definição de viscosidade realizada por Newton, em 1687, que foi o primeiro a perceber que a velocidade do fluxo (γ) é diretamente proporcional à tensão aplicada (σ): a constante de proporcionalidade é o coeficiente de viscosidade dinâmica (η) (AULTON, 2005).

Em sua abordagem matemática, Newton utilizou o modelo de duas placas de áreas A, separadas por uma distância h, movimentadas através da aplicação de uma força F. De acordo com esse modelo, a força requerida por unidade de área (F/A) para manter uma diferença de velocidade entre as placas (dv/dx) é diretamente proporcional ao gradiente de velocidade através do líquido. Assim, o coeficiente de proporcionalidade é igual à viscosidade (η). A força por unidade de área é conhecida como tensão de cisalhamento (σ) e o gradiente de velocidade é conhecido como taxa de cisalhamento (γ). Quando se pensa em taxas de cisalhamento estas são, na verdade, gradientes de velocidade (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). A partir disto, tem-se a equação de Newton para a viscosidade de um fluido:

(Equação 1)

$$\eta = \sigma / \gamma$$

Conforme a equação 1, quanto maior a viscosidade de um líquido, maior a tensão de cisalhamento necessária para produzir certa velocidade de cisalhamento.

Os fluidos são divididos em duas categorias gerais: newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independentemente da velocidade de cisalhamento aplicada. O fluxo não newtoniano apresenta uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Estes valores de viscosidade são considerados como viscosidade aparente, definida como razão

entre a tensão de cisalhamento medida a uma determinada taxa de cisalhamento. Por exemplo, a viscosidade aparente de uma suspensão é de 1000 mPa.s a 250 s⁻¹. Nota-se, então, que além do valor de viscosidade, devem ser informadas as condições de cisalhamento na qual aquele valor foi obtido (ANSEL et al., 2000).

Alguns fluidos necessitam de uma tensão finita, conhecida como tensão de escoamento, para que ocorra movimento das partículas. Estes são chamados fluidos plásticos. Para outros tipos de fluidos, os valores de viscosidade aumentam com o aumento da taxa de cisalhamento; neste caso, diz-se que o material possui um comportamento dilatante, como suspensões com alta percentagem de sólidos (AULTON, 2005).

Quando o contrário acontece, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento pseudoplástico. Em um sistema agregado, a diminuição da quantidade de líquido retido pelo agregado, devido ruptura da sua estrutura com a agitação, provoca uma diminuição da viscosidade, retomando a consistência inicial ao serem deixados em repouso (DULLAERT e MEWIS, 2005; FERREIRA et al., 2005; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Sendo assim, suspensões floculadas tendem a exibir fluxo plástico ou pseudoplástico, dependendo da concentração, enquanto dispersões defloculadas concentradas tendem a ser dilatantes. Isto significa que a viscosidade aparente de suspensões floculadas é relativamente alta quando a tensão de cisalhamento aplicada for baixa, mas decresce à medida que aumenta a tensão aplicada e as forças atrativas que produzem a floculação forem sobrepujadas (AULTON, 2005). Em relação à mudança de viscosidade com o tempo, o fluido é dito tixotrópico quando ocorre uma diminuição da viscosidade com o tempo, quando submetidos a uma taxa de cisalhamento constante, sendo o contrário nos fluidos reopéticos (LI, HOU, ZHU, 2007).

Quanto à sedimentação das partículas, verifica-se que se a densidade do sólido incorporado em um líquido for maior, ocorre um fenômeno de sedimentação governado pela lei de *Stokes*, onde a velocidade de sedimentação depende da diferença de densidades, do tamanho da partícula e da viscosidade do meio dispersante, conforme equação abaixo:

(Equação 2)

$$v = d^2 (\rho_i - \rho_e) g / 18 \eta$$

Em que:

v = velocidade de sedimentação

d^2 = diâmetro das partículas

ρ_i = densidade da partícula

ρ_e = densidade do meio

g = constante gravitacional

η = viscosidade do meio

Entretanto, esta lei só é válida se a fase dispersa for constituída por partículas esféricas de superfície lisa, que sedimentam de forma independente em um meio homogêneo e se forem desprezíveis os efeitos elétricos entre elas (WATSON; BARKER; ROBINS, 2005). Desta forma, verifica-se que as suspensões, especialmente em razão da elevada concentração da fase dispersa, e por apresentar partículas polidispersas não seguem inteiramente a lei de *Stokes*. Apesar disto, esta lei informa-nos que uma redução no tamanho da partícula ou um aumento da viscosidade do meio alteram a velocidade de sedimentação (NETZ e ORTEGA, 2002).

A redução do tamanho das partículas também é desejável para evitar possível cristalização de partículas maiores, característica de uma suspensão instável. É geralmente feita por trituração a seco antes da incorporação da fase dispersa no meio dispersante. Além destes fatores, o tamanho de partícula é de fundamental importância no que diz respeito à absorção pelo sistema circulatório, de fármacos com baixa solubilidade. Partículas com menor tamanho apresentam maior velocidade de dissolução, sendo mais rapidamente absorvidas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

A uniformidade e a precisão da dose dependem criticamente da sua homogeneidade no momento da administração. Como as suspensões tendem a sedimentar, a redispersibilidade é um aspecto importante da qualidade da formulação (DEICKE e SUVERKRUP, 2000). Desta forma, deve-se prevenir a formação do *caking*, que é um sedimento compacto não redispersível que não pode ser eliminado reduzindo o tamanho das partículas ou aumentando a viscosidade do meio. Isto porque partículas pequenas em um meio viscoso sedimentam-se mais vagorosamente do que partículas grosseiras, e após a sedimentação elas se acomodam em um sedimento mais compacto de difícil redispersão. Partículas em condição de sedimento compacto causado por sedimentação e por pressão das partículas superpostas experimentam assim, maiores forças de atração.

2. REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, Z. Particle adsorption and deposition: role of electrostatic interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100 –102, p. 267–347, 2003.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. **São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.**

ARBOLEYA, J.; WILDE, P. J. Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 485–491, 2005.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 677 p.

BARANY, S.; SZEPESSZENTGYFRGYI, A. Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 111, p. 117–129, 2004.

BARNES, H.Á.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. 1 ed. New York: Elsevier, 1989, 199 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/> Acesso em 02 de abril de 2007.

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 284–285, p. 458–463, 2006.

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

CARVALHO, P. R.A.; CARVALHO, C. G.; ALIEVI, P. T.; MARTINBIANCHO, J.; TROTTA, E. A. Identificação de medicamentos “não apropriados para crianças” em prescrições de unidade de tratamento intensivo pediátrica. **Jornal de pediatria**, v. 79, p. 397-399, 2003.

CROMWELL, P. F.; MUNN, N.; ZOLKOWSKI-WYNNE, J. Evaluation and Management of Hypertension in Children and Adolescents (Part Two): Evaluation and Management. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 19, p. 309-313, 2005.

DEICKE, A.; SUVERKRUP, R. Dose uniformity and redispersibility of pharmaceutical suspensions 2: assessment of three commercial erythromycin ethyl succinate oral liquids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 73-78, 2000.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2006.

DULLAERT, K.; MEWISB, J. Thixotropy: Build-up and breakdown curves during flow. **Journal of Rheology**, v. 49, n. 6, p. 1213-1230, 2005.

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

ELIAS, G. P.; ANTONIALI, C. MARIANO, R. C. Comparative study of rules employed for calculation of pediatric drug dosage. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 2, p. 114-9, 2005.

EUROPEAN COMISSION. Regulation (EC) No 1902/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 amending Regulation. Disponível em: <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/pediatrics/index.htm>. Acesso em 23 de setembro de 2007.

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

FALKNER, B.; DANIELS, S. R. High Blood Pressure in Children and Adolescents. Summary of the Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment. **Hypertension**, v. 44, p. 387-388, 2004.

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

FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista Escola de Minas**, v. 58, n. 1, p. 83-87, 2005.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: USP, 2003, 732p.

FLYNN, J. T. Pharmacologic Management of Childhood Hypertension: Current Status, Future Challenges. **American Journal of Hypertension**, v. 15, p. 30-33, 2002.

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

GARCIA, F. D.; TERRA, A. F.; QUEIROZ, A. M.; CORREIA, C. A.; RAMOS, P. S.; FERREIRA, Q. T.; ROCHA, R. L.; OLIVEIRA, E. A. Avaliação de fatores de risco associados com elevação da pressão arterial em crianças. **Revista Chilena de Pediatria**, v. 77, n. 5, p. 527-528, 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, 1436 p.

GROSSMAN, E.; MESSERLI, F. H. Long-Term Safety of Antihypertensive Therapy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49, n. 1, p. 16-25, 2006.

GUNGOR, N.; ALEMDAR A.; ATICI A.; ECE, O. The effect of SDS surfactant on the flow and zeta potential of bentonite suspensions. **Materials Letters**, v. 51, p. 250–254, 2001.

HARIF, T.; ADIN, A. Characteristics of aggregates formed by electroflocculation of a colloidal suspension. **Water Research**, v. 41, p. 2951 – 2961, 2007.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **E11-Clinical investigation of medicinal products in the pediatric population**, 2000.

IMPICCIATORE, P.; CHOONARA, I.; CLARRKSON, A.; PROVASI, D.; PANDOLFINI, C.; BONATI, M. Incidence of adverse adverse drug reactions in pediatric in/out - patients: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, p. 77-83, 2001.

JATO, J. L. V. **Tecnologia Farmacéutica: Formas Farmacéuticas**. v. 2. Espanha: Editorial Síntesis, 2001, 591 p.

JONG, G. W.; VULTO, A. G.; HOOG M. Unapproved and off-label use of drugs in a children's hospital. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1125, 2000.

KAMIBAYASHI, M.; OGURA, H.; OTSUBO, Y. Viscosity behavior of silica suspensions flocculated by associating polymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 592–597, 2005

KATZUNG, B. **Farmacologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 1008 p.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**, London: Pharmaceutical Press, 2000, p. 87-89 e 252-254.

KOROLKOVAS A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007/2008.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LACK, J. A.; STUART-TAYLOR, M. E. Calculation of drug dosage and body surface area of children. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, p. 601-605, 1997.

LANDE, M. B.; FLYNN, J. T. Treatment of hypertension in children and adolescents. **Pediatric Nephrology**, Educational Feature, DOI 10.1007/s00467-007-0573-4, 2007.

LI, Y.; HOU, W.; ZHU, W. Thixotropic properties of aqueous suspensions containing cationic starch and aluminum magnesium hydrotalcite-like compound. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 305–314, 2007.

LIMA, E. M. Avaliação de fatores de risco associados com elevação da pressão arterial em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 1, 2004.

MEINERS, M. M. M. A.; BERGSTEN-MENDES, G. Prescrição de medicamentos para crianças hospitalizadas: como avaliar a qualidade? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 332-7, 2001.

MEINERS, M. M. M. A.; BERGSTEN-MENDES, G. Medicamentos não aprovados para crianças em prescrições de 332 pacientes pediátricos hospitalizados. **Brasília Médica**, v. 39, n.4, p. 35-41, 2002.

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

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 299 p.

NHBPEP - National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. **The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents**. National heart, lung, and blood institute, Bethesda, Maryland. National Institute of Health, 2005.

OSUNTOKUN, B. Clinical trials in pediatrics: The drug delivery dimension **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 1, p. 90-105, 2006.

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

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

PETERLINI, M. A. S.; CHAUD, M. N.; PEDREIRA, M. L. G. Órfãos de terapia medicamentosa: a administração de medicamentos por via intravenosa em crianças hospitalizadas. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 11, n.1, p. 88-95, 2003.

PHENRAT, T.; SALEH, N.; SIRK, K.; KIM, H.; TILTON, R. D.; LOWRY, G. V. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. Research Paper. **Journal of Nanoparticle Research**, DOI 10.1007/s11051-007-9315-6, 2007

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

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

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil--ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 920 p.

RAKHMANNINA, N. Y.; ANKER, J. V. Pharmacological research in pediatrics: From neonates to adolescents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 58, n. 1, p. 4-14,2006.

REZENDE, D. F.; SCARPELLI, R. A. B.; SOUZA, G. F.; COSTA, J. O.; SCARPELLI, A. M. B.; SCARPELLI, P. A.; CARVALHO, G. B.; D'AGOSTINI, H. M.; PEDROSA, J. C. Prevalência da Hipertensão Arterial Sistêmica em Escolares de 7 a 14 anos do Município de Barbacena, Minas Gerais, em 1999. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, n. 4, p. 375-80, 2003.

SALGADO, C. M.; CARVALHAES, J. T. A. Hipertensão arterial na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 115-124, 2003.

SANTOS, A. A. C.; ZANETTA, D. M. T.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. O diagnóstico da hipertensão arterial na criança e no adolescente. **Pediatria**, v. 25, n. 4, p. 174-83, 2003.

SHIRKEY, H. Therapeutic orphans. **Pediatrics**, v. 104, p. 583 - 4, 1999.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

STANDING, J. F.; TULEU, C. Paediatric formulations—Getting to the heart of the problem. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 56–66, 2005.

SWEETMAN, S.C. (Ed), **Martindale: The Complete Drug Reference**. Pharmaceutical Press, London, UK, (electronic version) Disponível em: <<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>>, Acesso em 02 de agosto de 2007.

TERAYAMA, H.; INADA, K.; NAKAYAMA, H.; YASUEDA, S.; ESUMI, K. Preparation of stable aqueous suspension of a hydrophobic drug with polymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, p. 159-164, 2004.

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

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

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

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

VOGT, B. A. Hypertension in Children and Adolescents: Definition, Pathophysiology, Risk Factors, and Long-Term Sequelae. **Current Therapeutic Research**, v. 62, p. 283-297, 2001.

WARD, R. M.; BENITZ, W. E.; BENJAMIN, D. K.; BLACKMON, L.; GIACOIA, G. P.; HUDAK, M.; LASLO, T.; RODRIGUEZ, W.; SELEN, A. Criteria Supporting the Study of Drugs in the Newborn. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 9, 2006.

WATSON, A. D.; BARKER, G. C.; ROBINS, M. M. Sedimentation in bidisperse and polydisperse colloids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 286 p. 176–186, 2005.

WELLS, T.; STOWE, C. An Approach to the Use of Antihypertensive Drugs in Children and Adolescents. **Current Therapeutic Research**, v. 62, n. 4, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007, Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 24 de setembro de 2007.

WOLF-MAYER, K.; COOPER, R. S.; BANEGAS, J. R.; GIAMPAOLI, S.; HENSE, H. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada and the United States. **Journal of American Medical Association**, v. 289, n. 18, p. 2363-2369, 2007.

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

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

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

YOKOI, Y. Effects of sugar ester and hydroxypropyl methylcellulose on the physicochemical stability of amorphous cefditoren pivoxil in aqueous suspension. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 91-99, 2005.

CAPÍTULO II

**CARACTERIZAÇÃO DA HIDROCLOROTIAZIDA (HCTZ), DA
CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA (CMC-Na), DA
HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HPMC) E DA ÁGUA
PURIFICADA**

1. INTRODUÇÃO

A caracterização físico-química do fármaco bem como dos excipientes utilizados deve ser realizada antes do preparo da forma farmacêutica, no intuito de verificar sua identidade, teor, umidade, forma da partícula, entre outros, a fim de garantir que a matéria-prima utilizada apresente qualidade satisfatória.

Em uma suspensão farmacêutica a água é o componente mais representativo, podendo ser o de maior relevância como fonte contaminante. A água destilada, imediatamente após a condensação, é estéril, e na dependência de cuidados assépticos de coleta e estocagem será mantida desta forma (HUGO et al., 1998). Entretanto, para garantir a sua qualidade microbiológica e físico-química, o controle deve ser realizado antes de sua utilização, comprovando que cumpre com as especificações (AULTON, 2005; PINTO; KANEKO e OHARA, 2003).

Para realizar este estudo, são utilizadas metodologias descritas em farmacopéias como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ponto de fusão, espectroscopia na região do infravermelho e espectrofotometria na região do ultravioleta. Outras metodologias que não são preconizadas por compêndios oficiais, também podem ser utilizadas para análise das características termoanalíticas do fármaco e excipientes, como termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização físico-química realizada com a HCTZ matéria-prima e com os polímeros que foram utilizados nas formulações, além da caracterização físico-química e microbiológica da água purificada.

2. METODOLOGIA

2.1 Caracterização físico-química da HCTZ

Os testes de identificação para a HCTZ matéria-prima (Valdequímica, São Paulo, Brasil) foram realizados conforme descrito na Farmacopéia Americana (USP, 2003) e Farmacopéia Brasileira (1996) utilizando como substância química de referência HCTZ fornecida pela empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) sob número de produto 99H1207.

2.1.1 Descrição

Foram observados os caracteres físicos como coloração, odor e aparência da matéria-prima. Para verificar a solubilidade, utilizou-se acetona, água, etanol e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos. A faixa de fusão foi determinada pelo método do bloco metálico aquecido em aparelho Microquímica Ind Modelo MQAPF-301 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1996).

2.1.2 Ensaio de identificação

A identificação da matéria-prima foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho (IV) e na região do ultravioleta (UV). O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi realizado com o equipamento Perkin-Elmer modelo 1600, utilizando resolução de 4 cm^{-1} . As pastilhas foram preparadas com brometo de potássio (KBr), submetendo-as à análise entre $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$. Para verificar a absorção na região do ultravioleta uma solução de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ foi preparada em metanol e analisada em equipamento Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 10 utilizando cubetas de quartzo de 1 cm^3 . Utilizou-se a metodologia disponível na Farmacopéia Americana (2003), com posterior comparação dos espectros de referência disponíveis em Clarke's (2004).

2.1.3 Determinação da perda por dessecação

Pesa-filtros (\varnothing 52 mm x 48 mm) previamente dessecados e tarados foram adicionados de aproximadamente 1 g de HCTZ exatamente pesado. As amostras foram colocadas em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Os resultados de três determinações foram analisados e a média foi expressa em porcentagem (USP, 2003).

2.1.4 Doseamento

2.1.4.1 Reagentes

HCTZ (99H1207) e Clorotiazida (CTZ, 52K1441) substâncias de referência foram obtidas da Companhia Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). A HCTZ matéria-prima foi doada pelo LAFESC (Laboratório Industrial Farmacêutico de Santa Catarina, Florianópolis). A água ultra-pura foi obtida por um sistema de purificação Mili-Q[®] (Millipore, Bedford, USA). Metanol e acetonitrila de grau HPLC foram comprados da Vetec[®] (Rio de Janeiro). Todos os reagentes utilizados eram de grau farmacêutico.

2.4.1.2 Instrumental

O doseamento da HCTZ foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japan) equipado com bomba LC-10AD, detector UV SPD-10AV_{VP}, controlador SCL-10A_{VP}, degaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS_{VP}, sendo a injeção da amostra realizada por uma válvula Rheodyne 7125 contendo *loop* de 20 µL. A detecção foi fixada em 254 nm e a área do pico integrada automaticamente pelo programa Shimadzu Class VP[®] V 6.14. Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa (Phenomenex, Torrance, USA), com 250 mm x 4.6 mm D.I. e tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 40 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de tampão fosfato monobásico de sódio 0,1 M e acetonitrila (9:1), com pH 3,0 e fluxo de 2 mL/min (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1996).

2.1.4.3 Preparo das soluções amostra e padrão

Foram transferidos exatamente cerca de 30 mg de HCTZ matéria-prima para balão volumétrico de 200 mL, diluída com 10 mL de acetonitrila e completado o volume com fase móvel. Para o preparo da solução padrão foi dissolvida quantidade de HCTZ padrão de referência, exatamente pesada, na fase móvel para obter solução de concentração próxima a 0,15 mg mL⁻¹.

As soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo, os cromatogramas foram registrados e foram obtidas as áreas dos picos principais. A quantidade, em mg, de HCTZ encontrada foi calculada através da equação:

(equação 3)

$$200 C (Ra/Rp)$$

Em que:

C = concentração em mg/mL de HCTZ padrão na preparação padrão

Ra = áreas dos picos de HCTZ obtidas na preparação de ensaio

Rp = áreas dos picos de HCTZ obtidas na preparação padrão

A partir do valor obtido pela equação, foi calculado o teor de HCTZ em porcentagem, que deve estar entre 98 e 102 %.

2.1.5 Microscopia

Para este ensaio o fármaco foi espalhado na forma de pó, sem trituração, em uma lâmina de microscópio, onde foram obtidas imagens das partículas de HCTZ através de uma câmera acoplada no microscópio biológico trinocular modelo L-2000A Bioval. As imagens foram capturadas com aumentos de 100 vezes.

Para determinação do diâmetro das partículas foi utilizado o software *Size Meter*, desenvolvido no Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Em seguida a média dos diâmetros determinados no software foi avaliada graficamente com relação ao número de medidas, até que um valor constante de média fosse obtido, e a distribuição de tamanho das partículas foi construída.

2.2 Caracterização físico-química dos polímeros

A Hipromelose ou hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), designada comercialmente como Methocel K4M[®], proveniente da *Dow Chemical Company* foi doada pela empresa Colorcon do Brasil Ltda. A carboximetilcelulose sódica (CMC-Na), designada comercialmente como Denvercel[®] PH 2008A, foi doada pela empresa Denver Cotia Ltda.

2.2.1 Ensaio de identificação

A identificação dos polímeros foi realizada conforme metodologia descrita na Farmacopéia Americana (2007). A descrição dos testes pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1. Testes de identificação

Ensaio	Descrição
HPMC	
A	Verificar a estabilidade frente a soluções ácidas e básicas
B	Verificar a opalescência de uma solução 1 % resfriada a 20 °C
C	Verificar a formação de filme fino após a evaporação da solução B
CMC-Na	
A	Verificar o aparecimento de cor vermelha em solução ácida
B	Verificar a formação de precipitado branco

Fonte: Farmacopéia Americana (2007)

Complementando os ensaios anteriores, foi realizada a determinação do pH de uma solução a 1% (m/v) de cada polímero a 25 °C (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001; USP, 2007).

2.2.2 Perda por dessecação

Para o ensaio, pesa-filtros (\varnothing 52 mm x 48 mm) previamente dessecados e tarados foram adicionados de aproximadamente 1 g de cada polímero exatamente pesado. As amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por 2 horas para análise da HPMC e a 105 °C por 3 horas para análise da CMC-Na. Os resultados de três determinações foram analisados e a média foi expressa em porcentagem (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001; USP 2007).

2.3 Estudo termoanalítico da HCTZ e dos polímeros

2.3.1 Termogravimetria (TG)

A caracterização termogravimétrica foi realizada em uma termobalança TGA-50 da Shimadzu. Para os ensaios foram utilizados cadinhos de platina com massa de amostra de ~ 4 mg sob atmosfera dinâmica de N₂ (50mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura de 25 a 900 °C. O equipamento foi previamente calibrado com oxalato de cálcio monoidratado com perdas de massa bem definidas.

2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para caracterização termoanalítica as curvas DSC foram obtidas em uma célula DSC-60 Shimadzu utilizando cápsulas de alumínio fechadas com ~2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min até a temperatura de 400 °C. O equipamento foi previamente calibrado com índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J/g}$) e zinco (PF 419,6 °C).

Para a determinação da pureza da HCTZ utilizaram-se as condições acima, exceto na razão de aquecimento que foi realizada a 2 °C/min até 300 °C. O efeito das impurezas no ponto de fusão do fármaco foi analisado através da equação de *Van't Hoff*.

(equação 4)

$$T_f = T_0 - \frac{R T_0^2}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

Em que:

T_f = temperatura de fusão das impurezas

T₀ = ponto de fusão do material puro

R = constante dos gases

X = fração molar das impurezas

F = fração fundida em T_f

ΔH_f = calor de fusão

2.4 Análise físico-química da água purificada

A água foi purificada pelo processo de destilação, utilizando equipamento GFL modelo 2008. Na tabela 2 estão descritos os ensaios para as análises físico-químicas da água purificada.

Tabela 2. Ensaios físico-químicos da água purificada

Ensaio	Reagentes	Critério de aceitação
Aspecto	Observar a amostra contra luz	Límpido e incolor
Faixa de pH	Cloreto de potássio SR	5,0 – 7,0
Acidez	Papel azul de tornassol	Ausência de coloração vermelha
Alcalinidade	Papel vermelho de tornassol	Ausência de coloração azul
Substâncias oxidáveis	Ácido sulfúrico 1 M SR Permanganato de potássio 0,02 M SR	Coloração rosa
Cálcio e magnésio	Tampão de cloreto de amônio pH 10 SR Mordant black 11 EDTA 0,01 M SR	Coloração azul
Cloretos	Ácido nítrico 2 M SR Nitrato de prata 0,25 M SR	Nenhuma alteração na solução em 15 minutos
Sulfatos	Ácido clorídrico 2 M SR Cloreto de bário 12 %	Nenhuma alteração na solução em 1 hora
Amônia	Reagente de Nessler	Mistura límpida ou levemente amarelada

Fonte: British Pharmacopoeia, 2000; Farmacopéia Brasileira, 1988

2.5 Análise microbiológica da água purificada

As análises são realizadas segundo normas adotadas por cada país ou região. No caso brasileiro, os procedimentos utilizados são os do *Standard methods for examination of water and wastewater*, da *American Public Health Association* (CLESCERL; GREENBERG; EATON, 2005). A ANVISA apresenta normas para potabilidade da água destinada ao consumo humano na Portaria 518, de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004). Conforme o preconizado, a água para fins farmacêuticos deve apresentar limite máximo de 100 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) para bactérias aeróbias totais, e 10 UFC/mL para fungos e leveduras, e ausência de coliformes totais e fecais em 100 mL de amostra. A análise microbiológica da água é realizada através de duas etapas, a contagem

de microrganismos viáveis totais e a pesquisa de coliformes totais e fecais, conforme descrito abaixo.

2.5.1 Contagem de microrganismos viáveis totais

No aspecto quantitativo, foi avaliada a presença de microrganismos de um modo geral. Para realizar a contagem de viáveis, uma alíquota de 1 mL da amostra (água) foi transferida para uma placa de Petri estéril vazia. Em seguida o meio de cultura fundido foi vertido na placa, homogeneizado e mantido em repouso para solidificar. Para contagem de bactérias foi utilizado o ágar caseína soja com temperatura de incubação de 30 - 35 °C por 48 – 72 h. Para a contagem de fungos foi utilizado ágar dextrose batata, com incubação à 20 – 25 °C por 5 – 7 dias. Após o tempo de incubação foi realizada a contagem de colônias presentes nas placas e o resultado expresso como UFC/mL.

2.5.2 Pesquisa de coliformes totais e fecais

A pesquisa de coliformes é baseada nas características do grupo: bastonetes Gram-negativos, que produzem ácido e gás a partir de lactose. A determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes em uma amostra é efetuada a partir de aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas, uniformemente distribuídas na amostra (FILHO e OLIVEIRA, 2007). A técnica de NMP foi realizada seguindo o teste presuntivo e o teste confirmatório.

2.5.2.1 Teste presuntivo

Para o teste presuntivo foram utilizados cinco tubos contendo 10 mL de caldo lauril triptose com tubos de Durham invertidos aos quais foram adicionados 20 mL de amostra. Posteriormente, os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas e então se verificou a presença de gás e turvação (teste positivo). Os tubos do teste presuntivo que apresentaram resultado positivo, foram submetidos ao teste confirmatório.

2.5.2.2 Teste confirmatório para coliformes totais

Um inóculo da cultura positiva foi transferido com auxílio de uma alça de platina flambada, para um tubo contendo caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2 %, incubado a $35 \pm 0,5$ °C, durante 24 - 48 h.

2.5.2.3 Teste confirmatório para coliformes fecais (Termorresistentes – *E.coli*)

Da mesma forma que o teste anterior, foi retirado um inóculo da cultura positiva e transferido para o caldo *E. coli* (E.C.) mantido a $44,5 \pm 0,2$ °C, em banho-maria com agitação, durante 24 h.

2.5.2.4 Expressão dos resultados

Após os períodos determinados de incubação para os dois testes confirmatórios, foram efetuadas as leituras considerando como resultado positivo, para coliformes totais, a produção de gás com turvação do meio verde brilhante e bile a 2 %. A presença de coliformes fecais foi confirmada pela produção de gás com turvação no meio E.C. O cálculo do NMP foi realizado a partir dos dados combinados, utilizando tabelas disponíveis na Farmacopéia Brasileira (1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da HCTZ

3.1.1 Descrição

Os resultados do teste de descrição da matéria-prima estão descritos na tabela 3 e demonstram que a mesma confere com as especificações farmacopéicas.

Tabela 3. Testes de descrição para HCTZ

Teste	Especificações	Resultados
Caracteres físicos	Pó cristalino branco ou quase branco, inodoro	Conforme
Solubilidade	Muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em álcool, solúvel em acetona e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos	Conforme
Faixa de fusão	266 - 270 °C	268,1–269,6 °C

3.1.2 Ensaio de identificação

3.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do IV fornece informações sobre a estrutura e a conformação molecular da substância no estado sólido por investigar as vibrações dos átomos. No setor farmacêutico é usada em inúmeras aplicações, como identificação de fármacos, avaliação da pureza, cristalinidade e estudos de compatibilidade (LOPES e FASCIO, 2004; KALINKOVA, 1999).

As figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, a estrutura química da HCTZ e o seu espectro de IV, onde se verifica que as principais bandas de absorção estão presentes, estando de acordo com o apresentado na literatura. Na região de 3300 cm^{-1} observa-se banda representando a amina secundária e em 1602 cm^{-1} há a presença de amina primária. O grupo CH tem sua banda em 1318 cm^{-1} , enquanto que em 1150 cm^{-1} fica evidenciado o Cl. Na região de 3100 cm^{-1} há a presença de anel aromático (CLARKE'S, 2004; SILVERSTAIN e WEBSTER, 2000).

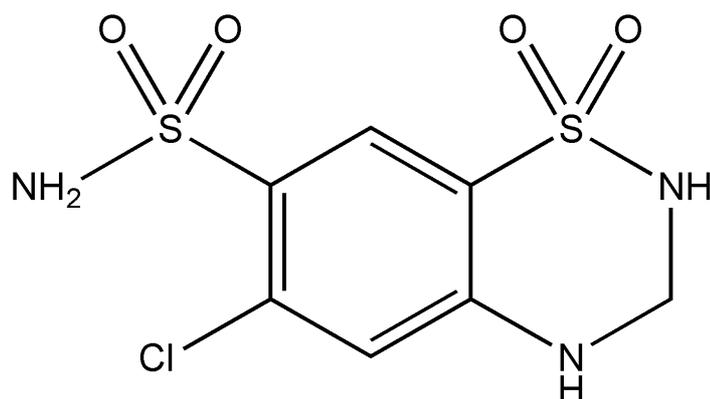


Figura 4. Estrutura química da HCTZ

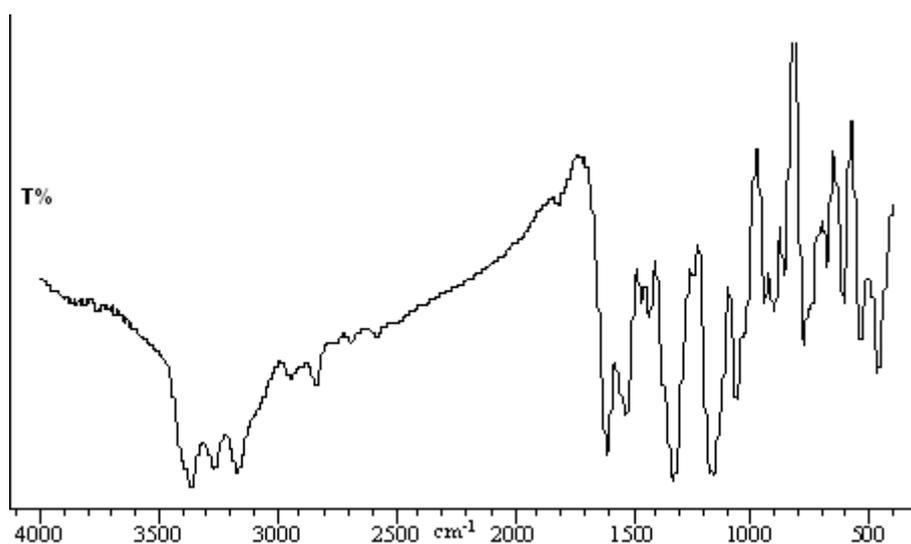


Figura 5. Espectro de absorção na região do infravermelho da HCTZ obtido com pastilhas de brometo de potássio (KBr)

3.1.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

O espectro de absorção ultravioleta da HCTZ (figura 6) exibiu dois máximos, em 225 e 265 nm, estando de acordo com o descrito na literatura (CLARKE'S, 2004).

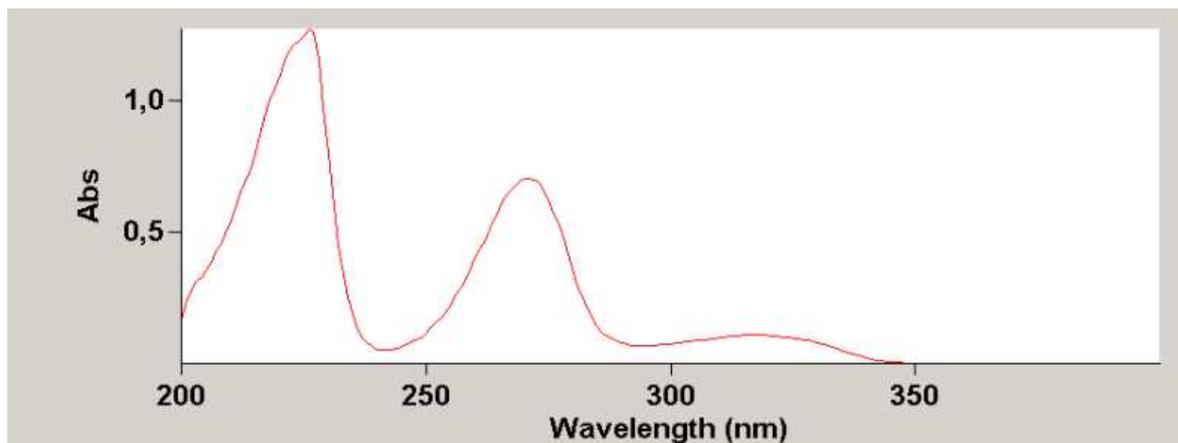


Figura 6. Espectro de absorção na região do UV da HCTZ em metanol (10 µg/mL)

3.1.3 Perda por dessecação

O método utilizado baseia-se na perda por dessecação em estufa e visa determinar a quantidade de substância(s) volátil (eis) de qualquer natureza eliminada(s) nas condições especificadas na monografia. Durante e após o processo de purificação de fármacos é importante que se procedam operações de dessecação para reduzir a reatividade química da água remanescente, traduzindo-se numa diminuição da atividade da água no produto, levando a melhor conservação pela diminuição de reações de degradação química.

Com relação à perda por dessecação, a porcentagem obtida foi de 0,4 %. Considerando o limite farmacopéico de perda por dessecação de até 0,5 %, a HCTZ pode ser aprovada quanto a este parâmetro por meio da metodologia empregada.

3.1.4 Doseamento

A Farmacopéia Brasileira (1996) estabelece na monografia do fármaco valores entre 98 e 102 %. O teor de HCTZ (matéria-prima) obtido através do método cromatográfico foi 99,8 % ± 0,6 % (n = 6) , confirmando a adequada pureza da amostra.

3.1.5 Microscopia

O exame microscópico do fármaco é uma etapa importante na pré-formulação, pois proporciona indicações sobre o tamanho e forma da partícula.

Foram verificados os diâmetros de um total de 156 partículas de HCTZ, como forma de padronizar a análise, diminuir o desvio padrão e obter uma melhor distribuição de tamanho. A média dos diâmetros determinada no *software* Size Meter foi de $274,7 \mu\text{m} \pm 3,3$, e o gráfico de distribuição de tamanho das partículas pode ser visualizado na figura 7.

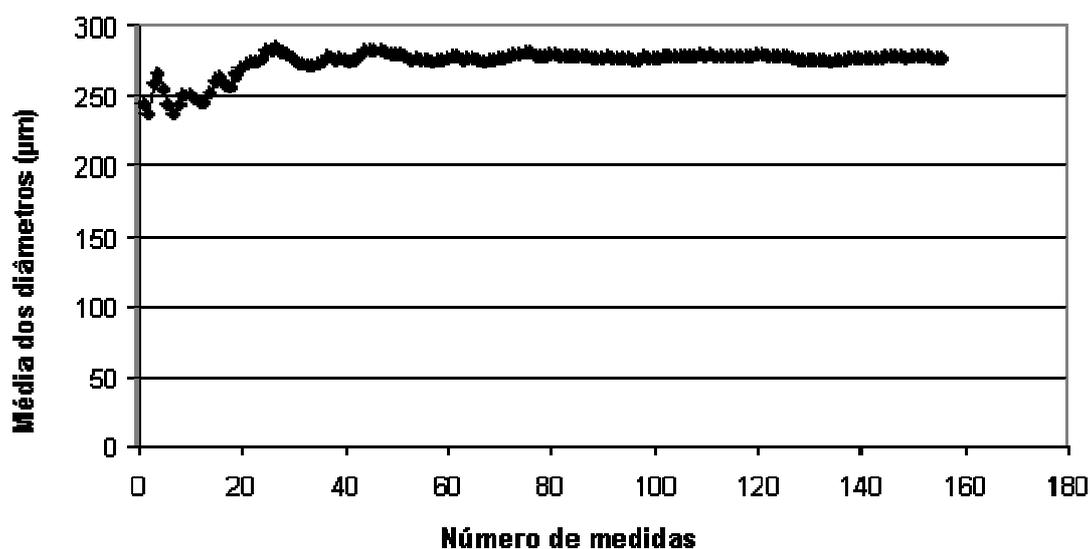


Figura 7. Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ.

Na figura 8 pode ser visualizada uma fotomicrografia das partículas de HCTZ, onde se verifica que estas apresentam formato esférico irregular.



Figura 8. Fotomicrografia de partículas de HCTZ (aumento de 100x).

3.2 Caracterização físico-química dos polímeros (CMC-Na e HPMC)

3.2.1 Ensaio de identificação

Uma formulação bem-sucedida de uma forma farmacêutica estável e eficaz depende da seleção cuidadosa dos excipientes que serão adicionados (AULTON, 2005). Após a escolha dos excipientes mais adequados à formulação, é imprescindível realizar a caracterização físico-química, de forma a otimizar o desenvolvimento de medicamentos, garantindo a qualidade e eficácia do produto final. Os resultados dos testes de identificação da HPMC e da CMC-Na encontram-se descritos na tabela 4, comprovando a identidade dos mesmos.

Tabela 4. Testes de identificação para HPMC e CMC-Na.

Polímero	Teste	Especificações	Resultados
HPMC	A	Mistura estável	De acordo
	B	Mucilagem opalescente	De acordo
	C	Formação de filme fino	De acordo
	pH	5,5 – 8,0	7,2
CMC-Na	A	Aparecimento de cor vermelha	De acordo
	B	Formação de precipitado	De acordo
	pH	6,5 – 8,5	7,0

3.2.2 Perda por dessecação

A porcentagem calculada para perda por dessecação para a HPMC foi de 2,3 % e para a CMC-Na foi de 5,6 %. Considerando o limite farmacopéico de perda por dessecação de até 5 % para HPMC e 10 % para CMC-Na, os dois polímeros podem ser aprovados quanto a este parâmetro por meio da metodologia empregada.

3.3 Caracterização termoanalítica

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (GIRON, 2002).

Os métodos termoanalíticos vêm sendo amplamente aplicados ao estudo de fármacos. Mesmo não constituindo técnicas oficiais, são muitos os trabalhos que se utilizam dessas metodologias como alternativas em estudos de pré-formulação, na caracterização e controle de qualidade de materiais farmacêuticos (BASU; ALEXANDER; RIGA, 2006; BUCCI; MAGRI; MAGRI, 2000; VECCHIO et al., 2004).

Dentre todas as técnicas desse grande grupo, as mais utilizadas na caracterização de materiais farmacêuticos são a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG). Estas são técnicas que dependem do equilíbrio térmico na amostra. Variáveis que afetam significativamente os resultados obtidos por estes métodos incluem a homogeneidade e o tamanho da amostra, o tamanho das partículas, a velocidade de aquecimento e a atmosfera em que a amostra se encontra (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001; MENDHAM, et al., 2000).

3.3.1 HCTZ

A HCTZ foi caracterizada termicamente por DSC e TG. A curva DSC da HCTZ (figura 9) demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 266,9 a 273,4 °C, com um consumo de energia de 131,93 J/g, característico do processo de fusão da substância. A curva demonstra que a substância apresenta um T_{peak} de fusão de 270,2 °C, confirmando o preconizado na literatura (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996). A decomposição do fármaco é evidenciada após a fusão, em aproximadamente 290 °C.

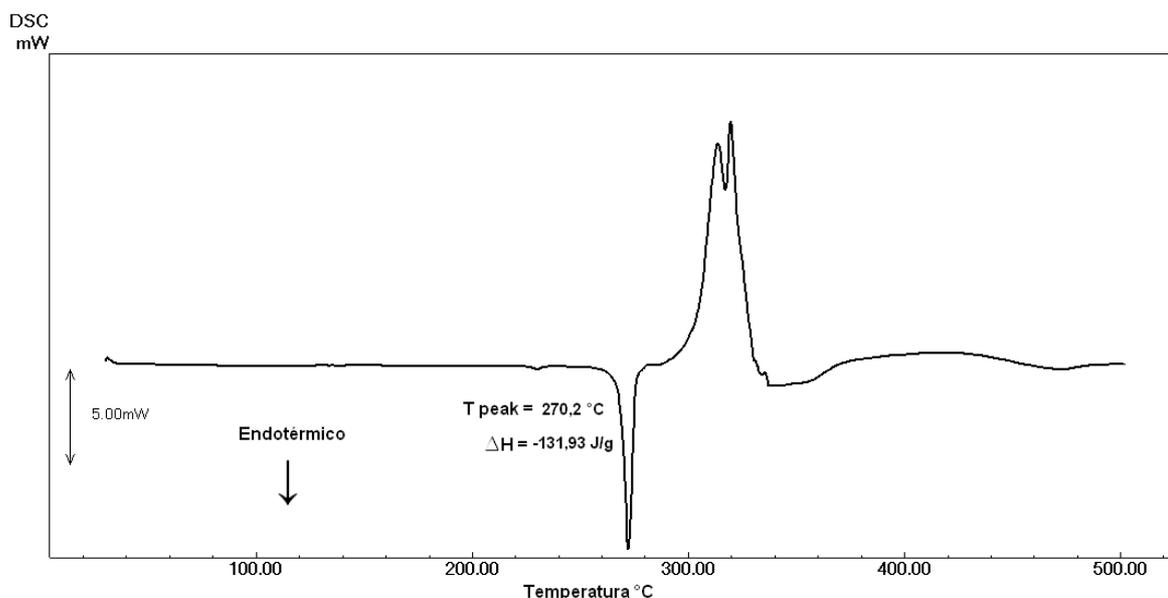


Figura 9. Curva DSC da HCTZ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

A pureza da HCTZ foi avaliada através da técnica DSC, pela observação da diminuição da temperatura e entalpia de fusão. A fusão de um material puro e 100 % cristalino deve apresentar-se como um pico fino e bem definido, porém, impurezas ou defeitos na estrutura do cristal podem alargar a faixa de fusão e diminuir o ponto de fusão característico do fármaco (FORD e TIMMIS, 1989; VECCHIO et al., 2004).

A determinação da pureza por DSC é explicada pela teoria da não linearidade, ou seja, a área onde normalmente é iniciada a fusão é decorrente da fusão das impurezas, justificando um processo não linear. Através da aplicação da equação de *Van't Hoff*, a pureza da HCTZ encontrada por meio da técnica de DSC foi de 99,5 %, com um T_{onset} de 268 °C, consumindo 45,83 J/g. O resultado é comparável com o demonstrado por CLAE (teor de 99,8 %). Com base nestes resultados, considera-se que o fármaco possui uma pureza satisfatória, considerando que os ensaios foram realizados com a matéria-prima e não com a substância padrão.

Os dados DSC são confirmados pelas análises TG/DTG (figura 10) que demonstram que o fármaco é termo-estável até próximo de 290 °C. Nesta temperatura ocorre um evento de perda de massa de aproximadamente 75,4 %.

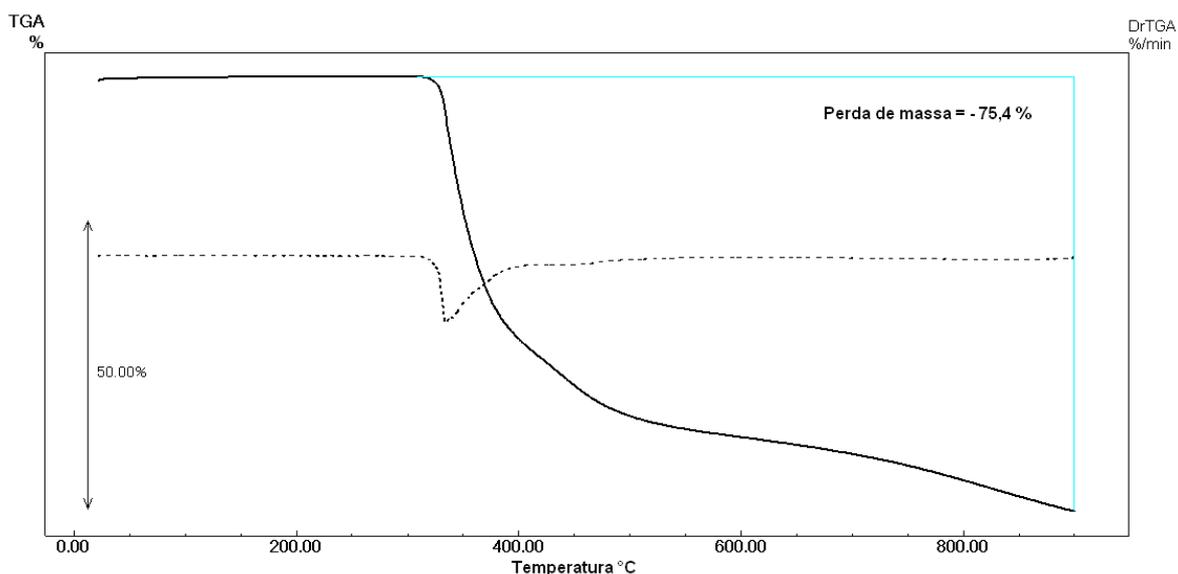


Figura 10. Curva TG/DTG da HCTZ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

3.3.2 CMC-Na e HPMC

Da mesma forma que o princípio ativo, é importante que os excipientes sejam caracterizados quanto ao perfil termoanalítico de forma a possibilitar o conhecimento de parâmetros como teor de umidade e estabilidade térmica.

As curvas DSC e TG da CMC-Na são apresentadas na figura 11. De acordo com o perfil termoanalítico observado através da TG, verifica-se a eliminação de água entre 28 e 80 °C com perda de massa (Δm) de 3,7 %. A CMC-Na mostrou-se estável até a temperatura de 262 °C seguindo com a decomposição térmica com Δm de 67,15 %. A curva DSC demonstra eventos exotérmicos de degradação a partir da temperatura de 262 °C, confirmando os resultados de TG. Não foi possível visualizar o evento de fusão por tratar-se de amostra polimérica com baixa cristalinidade.

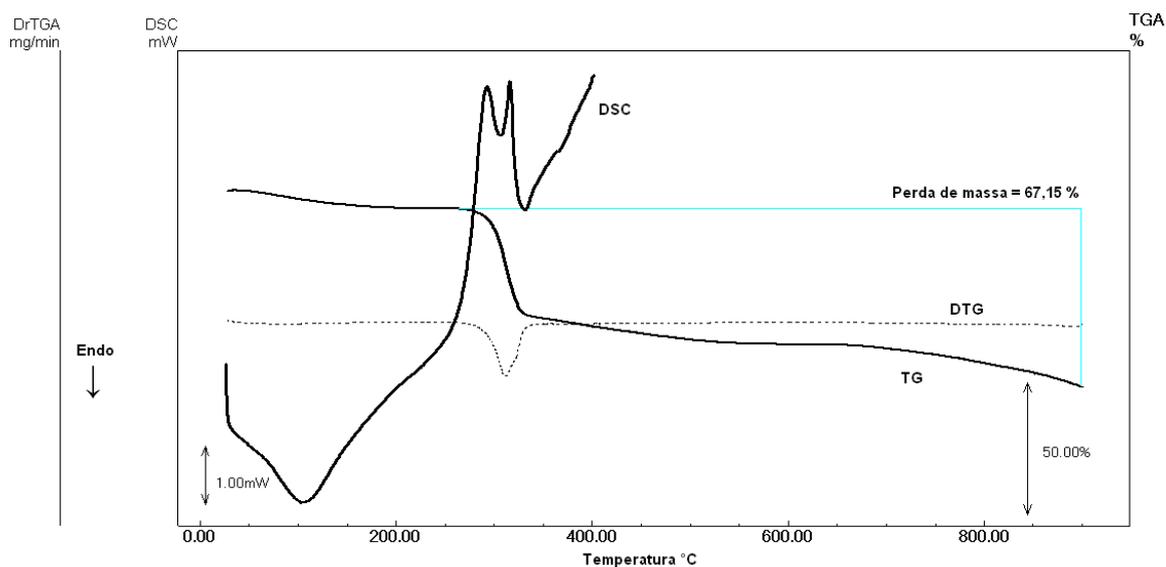


Figura 11. Curvas DSC e TG/DTG da CMC-Na em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

O perfil termoanalítico da HPMC (figura 12) apresenta perda de massa inicial de 3 %, consequência da eliminação de água. A estabilidade do polímero deu-se até 278 °C com Δm de 90,4 %. A curva DSC da HPMC apresentou eventos de degradação acima de 278 °C, não evidenciando o evento de fusão, devido à característica amorfa do polímero.

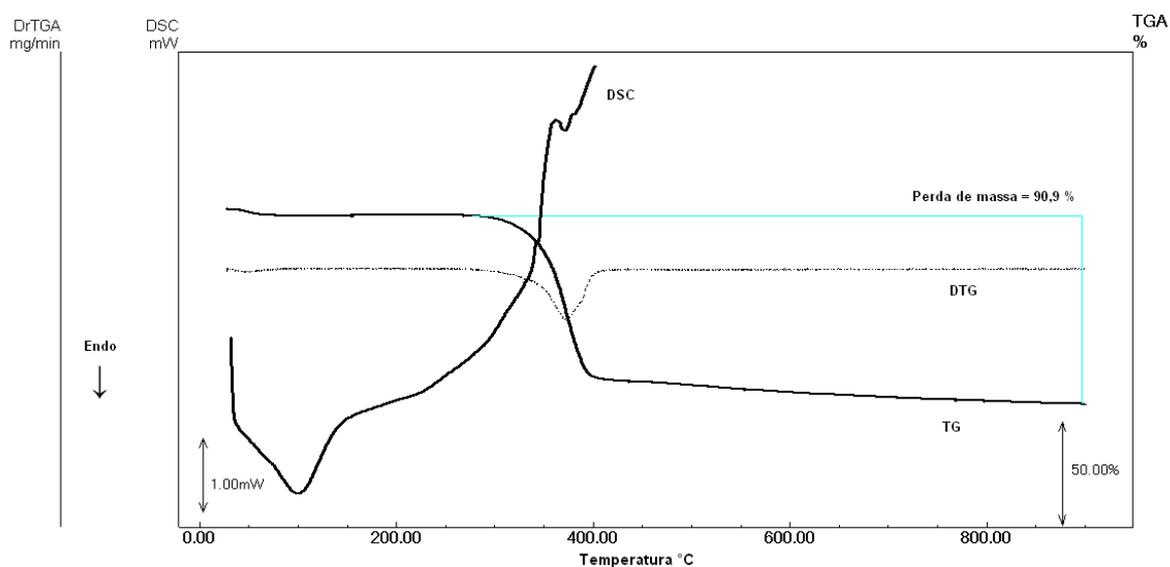


Figura 12. Curvas DSC e TG/DTG da HPMC em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

3.4 Análise físico-química da água purificada

A água potável para ser utilizada como componente de preparações farmacêuticas deve ser purificada e atender aos limites de contaminantes orgânicos e inorgânicos estabelecidos pelas farmacopéias. Os metais pesados são interferentes que indicam possibilidade de contaminação ambiental. Uma das conseqüências refere-se à complexação de metais com moléculas do fármaco, favorecendo o aparecimento de compostos destituídos de valor terapêutico (MACEDO, 2003; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

Os resultados obtidos nos ensaios para a água purificada obtida por destilação estão apresentados na tabela 5, onde se verifica que os mesmos foram concordantes com os parâmetros físico-químicos especificados (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2000).

Tabela 5. Análise físico-química da água purificada

Ensaio	Critérios de aceitação	Resultado
Aspecto	Límpido e incolor	Conforme
Faixa de pH	5,0 – 7,0	Conforme
Acidez	Ausência de coloração vermelha	Conforme
Alcalinidade	Ausência de coloração azul	Conforme
Substâncias oxidáveis	Coloração rosa	Conforme
Cálcio e magnésio	Coloração azul	Conforme
Cloretos	Nenhuma alteração na solução em 15 min	Conforme
Sulfatos	Nenhuma alteração na solução em 1 h	Conforme
Amônia	Mistura límpida ou levemente amarelada	Conforme

3.5 Análise microbiológica da água purificada

Na contagem de viáveis totais não foi observado o crescimento de colônias, tanto de bactérias como de fungos, estando de acordo com o preconizado na literatura (CLESCERL; GREENBERG; EATON, 2005).

Através da aplicação da técnica dos tubos múltiplos foi determinado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes na amostra de água destilada. Não foi observada

turvação e nem formação de gás em nenhum dos tubos do teste presuntivo. De acordo com a tabela de NMP (disponível na Farmacopéia Brasileira 1988), o resultado é expresso como $< 1,1$ NMP/mL, para coliformes totais e fecais. Com isso, permite-se classificar a água purificada como adequada para a preparação das suspensões em estudo.

4. CONCLUSÕES

Os ensaios farmacopéicos utilizados para caracterização e identificação da HCTZ demonstraram a igualdade desta com o descrito na literatura, atestando sua autenticidade;

As análises para identificação e determinação da perda por dessecação dos polímeros atestam sua conformidade para uso nas formulações;

O estudo das imagens obtidas por microscopia possibilitou determinar o diâmetro médio das partículas de HCTZ;

O doseamento da HCTZ atendeu aos requisitos farmacopéicos;

A caracterização termoanalítica do fármaco e dos polímeros permitiu analisar o perfil termoanalítico e estabilidade térmica, assim como a pureza do fármaco;

Os ensaios físico-químicos e microbiológicos da água utilizada na preparação das suspensões demonstraram que esta cumpre com os requisitos preconizados em compêndios oficiais.

5. REFERÊNCIAS

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 677 p.

BASU, P.; ALEXANDER, K. S.; RIGA, A. J. A Statistical Model for the Optimization of Dsc Performance in the Evaluation of Drugs for Preformulation Studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v, 83, n. 1, p. 19–22, 2006.

BUCCI, R.; MAGRÌ, A. D.; MAGRÌ, A. L. DSC in the Chemical Analysis of Drugs. Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 61, n. 2, p. 369-376, 2000.

CLARKE'S Analysis of Drugs and Poisons. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version, 2004.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4 ed. Strassbourg: Convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. Primeiro fascículo. São Paulo: Atheneu, 1996.

FORD, J. L.; TIMMIS, P. "The use of thermal analysis in the purity determination of pharmaceuticals". In: **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications**; England: Ellis Horwood, Chichester, 1989.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

KALINKOVA, G. N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational spectroscopy**, v. 19, p. 307-320, 1999.

HUGO, W. B.; RUSSEL, A. D. **Pharmaceutical Microbiology**. 6 ed. London: Blackwell Science, 1998.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros técnicos e científicos, 2000.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, Livros técnicos e científicos, 2006.

USP - THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 26 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2003.

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

VECCHIO, S.; CATALANI, A.; ROSSI, V.; TOMASSETI, M. Thermal analysis study on vaporization of some analgesics. Acetanilide and derivatives. **Thermochemica Acta**, v. 420, p. 99-104, 2004.

CAPÍTULO III

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA (HCTZ)

1. INTRODUÇÃO

As suspensões podem ser definidas como formas farmacêuticas que contêm partículas do fármaco em dispersão relativamente uniforme num veículo no qual este apresente uma solubilidade mínima (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

São muitos os fatores que devem ser considerados no desenvolvimento e na preparo de uma adequada suspensão farmacêutica. Uma formulação desejável deve sedimentar lentamente e voltar a dispersar-se com agitação suave do recipiente, o tamanho das partículas deve permanecer constante e a suspensão deve escoar com rapidez e uniformidade do recipiente, além de ter estabilidade química e boa aparência (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; USP, 2007).

A formulação ideal de uma suspensão seria um sistema defloculado com viscosidade elevada para prevenir a sedimentação, contudo, isso não garante a homogeneidade. Por isso, é usual formular a suspensão de modo que seja parcialmente floculada, para permitir uma redispersão adequada quando necessário e com uma viscosidade ajustada de modo que a velocidade de sedimentação seja a mínima possível (AULTON, 2005; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

O controle da floculação normalmente é feito combinando-se o controle do tamanho da partícula e do potencial zeta, entre outros, e a adição de polímeros que permitam a ocorrência de ligações cruzadas entre as partículas (LI et al., 2007; SAVITSKAIA; NEVAR; GRINSHPAN, 2006; YOKOI, 2005).

No que diz respeito à degradação de fármacos, o processo de hidrólise é a causa mais freqüente, porque grande número de princípios ativos são ésteres ou contêm outros agrupamentos como amidas substituídas, lactonas e lactoneaminas, que são susceptíveis ao processo hidrolítico (CARSTENSEN e RHODES, 2000; FLORENCE e ATTWOOD, 2003). A hidroclorotiazida (HCTZ) é um exemplo de fármaco que sofre hidrólise, sendo que o controle do pH é de suma importância para a estabilidade da formulação.

A qualidade microbiológica de um produto farmacêutico é influenciada pelo ambiente em que é preparada e pelas matérias-primas utilizadas na formulação, sendo que deve ser avaliada para garantir a segurança do consumidor e a estabilidade da formulação (HUGO et al., 1998; NIAZI, 2004). Suspensões devem conter quantidade suficiente de conservantes para proteger a formulação da contaminação por bactérias e fungos, e a

eficácia do conservante deve ser avaliada por meio do teste do desafio (RUSSELL, 2003; USP, 2007).

O desenvolvimento de uma formulação líquida de HCTZ na forma de uma suspensão está apresentado no presente capítulo. São igualmente apresentadas as análises físico-químicas e microbiológicas das suspensões contendo o fármaco.

2. METODOLOGIA

2.1 Desenvolvimento das suspensões farmacêuticas

Para o desenvolvimento de uma suspensão estável física e quimicamente existe a necessidade de avaliar a influência de diferentes concentrações de polímeros com diferentes características iônicas. Para isso, foram utilizados dois polímeros, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC = não-iônico) e a carboximetilcelulose sódica (CMC-Na = aniônico) e duas variações de porcentagens de conteúdo do polímero (HPMC 0,6 e 0,8 % e CMC-Na 0,4 e 0,6 %). Estas concentrações de polímero foram escolhidas após ensaios preliminares utilizando concentrações de 0,1 a 1 % de cada polímero.

A composição de cada formulação desenvolvida esta descrita na tabela 6.

Tabela 6. Composição das formulações (F1, F2, F3 e F4), para suspensão de HCTZ 2,5 mg/mL

	F1	F2	F3	F4
HCTZ	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
HPMC	_____	_____	0,6 %	0,8 %
CMC-Na	0,4 %	0,6 %	_____	_____
Glicerina	2 %	2 %	2 %	2 %
Benzoato Na	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Ácido cítrico	q.s. pH 3,3	q.s. pH 3,3	q.s. pH 3,3	q.s. pH 3,3
Água destilada	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL

Os polímeros (HPMC e CMC-Na) atuam na formulação como agentes suspensores, aumentando a viscosidade do meio. A glicerina é um agente molhante, o benzoato de sódio atua como conservante, e o ácido cítrico é responsável pela diminuição do pH.

2.1.1 Preparo das suspensões

Inicialmente 1 g de cada polímero foi disperso em 100 mL de água, contendo benzoato de sódio, a 40 °C sob constante agitação, até a obtenção de uma solução viscosa

homogênea. À parte deste processo, pesou-se em balança analítica uma quantidade suficiente de HCTZ matéria-prima para obter uma concentração final de 2,5 mg/mL. Esta foi transferida para um gral de porcelana, sendo triturada com pistilo para redução do tamanho das partículas, e posteriormente levigada com glicerina. Com um cálice de vidro graduado, foi realizada a medida de quantidade suficiente de solução polimérica (1 %) para obtenção de cada formulação descrita anteriormente. A HCTZ foi adicionada a esta solução, o pH corrigido com solução de ácido cítrico (pH 3,3), e o volume restante completado com água destilada contendo benzoato de sódio como conservante. Para cada formulação em estudo foi preparado um lote do produto para assegurar a homogeneidade para a realização de todos os estudos. As suspensões foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e rotuladas.

2.2 Caracterização físico-química das suspensões

2.2.1 Determinação das características organolépticas

As características organolépticas de cada formulação foram determinadas quanto: o sabor, o odor e a aparência das formulações (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

2.2.2 Determinação do pH

Empregou-se a metodologia preconizada na Farmacopéia Brasileira, 1988, com eletrodo de vidro em medidor de pH/mV marca WTW pH 3300i. As amostras não foram diluídas e a medida do pH de cada formulação foi realizada em triplicata.

2.2.3 Potencial zeta

Os experimentos foram realizados em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments, Inglaterra), no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da USP (Ribeirão Preto) sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Juliana Maldonado Marchetti. O potencial zeta das suspensões foi determinado a partir da mobilidade eletroforética por Anemometria Laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm. As amostras foram analisadas em triplicata.

2.2.4 Tamanho de partícula

Uma alíquota (1 mL) de cada suspensão foi colocada sobre uma lâmina de vidro e analisada em um microscópio biológico trinocular modelo L-2000A Bioval, onde foram obtidas imagens das partículas através de uma câmera acoplada ao microscópio. As partículas foram fotografadas com aumentos de 100, 400 ou 1000 vezes, dependendo da amostra.

Para determinação do diâmetro das partículas foi utilizado o *software Size Meter*, desenvolvido no Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Em seguida a média dos diâmetros determinados no *software* foi avaliada graficamente com relação ao número de medidas, até que um valor constante de média fosse obtido, e a distribuição do tamanho das partículas foi construída.

2.2.5 Volume de sedimentação

Para determinar o volume de sedimentação, cada suspensão analisada foi previamente homogeneizada em agitador magnético durante 5 min. Após, cada formulação foi transferida para uma proveta graduada de 100 mL e mantida em repouso pelo tempo necessário para completa sedimentação. O volume de sedimentação foi medido diretamente na proveta, sendo que as medidas foram realizadas em triplicata em intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8 e 24 h, sem agitação.

O volume de sedimentação (F), é definido como a razão entre o volume final de sedimento em equilíbrio, V_f e o volume total V_0 antes da sedimentação, (MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993), sendo expresso pela equação 5:

(Equação 5)

$$F = V_f/V_0$$

2.2.6 Redispersibilidade

As formulações foram mantidas em repouso em seus frascos por 1 semana antes do ensaio, para completa sedimentação das partículas. O ensaio foi realizado manualmente, seguindo metodologia proposta por Kittipongpatana e colaboradores (2006), com as

formulações em seus frascos originais, realizando movimentos verticais de 180°, repetidos até a completa redispersão.

O tempo necessário para redispersar o sedimento foi marcado com um cronômetro e o resultado expresso em segundos (s). As medidas foram realizadas em triplicata para cada formulação. No caso de não ocorrer a redispersão no tempo máximo de 1 minuto, os frascos foram agitados vigorosamente e o resultado expresso como “av”.

2.2.7 Avaliação do comportamento reológico

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), no Laboratório Instrumental do Curso de Farmácia sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Tania Mari Bellé Bresolin.

As características reológicas das suspensões foram avaliadas com o auxílio de um viscosímetro rotacional cilindro-coaxial Haake, modelo VT550, utilizando sensor MV1 e copo MV. Os reogramas foram obtidos pela representação gráfica da viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$).

Devido à característica das suspensões de apresentar partículas suspensas, que poderiam vir a interferir na sensibilidade do sensor, foi realizada uma padronização das amostras antes da análise, através de um pré-tratamento mantendo uma taxa de cisalhamento de 100 s⁻¹ durante 120 s, e então permanecendo em um período sem cisalhamento de 180 s. A caracterização reológica das amostras foi então realizada através de rampas de cisalhamento ascendentes de 0 a 300 s⁻¹ por 200 s, mantendo este cisalhamento por 30 s, e descendentes de 300 a 0 s⁻¹ em 200 s (WANG e GUO, 2006). Uma vez que a unidade derivada de força por unidade de área no sistema internacional (SI) é o Pascal (Pa), a viscosidade foi expressa em mPas. As medidas foram realizadas em triplicata com temperatura controlada de 25 °C.

Para descrever o comportamento de fluxo foi utilizada a equação da lei da força:

(Equação 6)

$$\sigma = k (\dot{\gamma})^n$$

Em que:

σ = tensão de cisalhamento

γ = taxa de cisalhamento

k = constante (índice de consistência)

n = índice de fluxo

Se $n = 1$ o fluido é newtoniano, se $n < 1$, o fluido é pseudoplástico e se $n > 1$ o fluido é dilatante (BEZERRIL et al., 2006; YASAR; TOGRUL; ARSLAN, 2007).

2.2.8 Doseamento de HCTZ na suspensão

Não foi observada a existência de metodologia oficial para determinação de HCTZ em formulações líquidas, desta forma foi necessário o desenvolvimento e validação de metodologia analítica. A quantificação da HCTZ nas formulações desenvolvidas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas condições descritas a seguir.

2.2.8.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV_{VP}, unidade de controle SCL-10A_{VP} e injetor Rheodyne 7125. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) e o sistema mantido a temperatura de 40 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de tampão fosfato de sódio 0,1 M:acetonitrila (70:30 v/v) ajustada a pH 3,0. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,3 mL/min, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 μ L. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do *software* Shimadzu Class VP[®] V 6.14.

2.2.8.2 Preparo da solução amostra

Antes das análises, os frascos contendo as suspensões foram mantidos em agitador magnético por 60 segundos para assegurar a homogeneidade das alíquotas na tomada de amostra. Uma alíquota de suspensão contendo HCTZ 2,5 mg/mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 25 mL contendo 2 mL de metanol, levado à agitação em banho de ultrassom por 10 minutos e diluída com fase móvel obtendo-se uma

concentração final de 30 µg/mL. A solução final foi filtrada em papel filtro contendo 0,45 mm de poro.

2.2.8.3 Preparo da solução padrão

Uma solução estoque (1000 µg/mL) foi preparada dissolvendo-se 25 mg da substância química de referência de HCTZ em 2 mL de acetonitrila e 10 mL de fase móvel em um balão volumétrico de 25 mL, sendo homogeneizada em agitador magnético por 10 minutos. O volume foi completado com fase móvel. Uma solução estoque de clorotiazida (CTZ) substância química de referência (1000 µg/mL) também foi preparada com fase móvel.

2.2.8.4 Validação da metodologia

O processo de validação foi determinado através dos seguintes parâmetros, de acordo com a ICH (2005): especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de quantificação e detecção. A ICH recomenda também a realização de estudos de *stress* para elucidar as características de estabilidade da substância ativa. Um método indicativo de estabilidade deve quantificar o fármaco e identificar seus produtos de degradação.

2.2.8.4.1 Conformidade do sistema

Previamente aos ensaios das amostras por CLAE, foi verificada a conformidade do sistema através da injeção de 6 replicatas de uma solução de HCTZ (30 µg/mL) para avaliar a repetibilidade das áreas dos picos, tempo de retenção, assimetria e número de pratos teóricos.

2.2.8.4.2 Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, foi visualizada a ausência de interferências pelos excipientes que fazem parte da suspensão de HCTZ (solução placebo) e uma solução de HCTZ (1000 µg/mL) foi submetida à degradação acelerada em condições ácidas, alcalinas, neutras, oxidativas, fotolíticas e de stress térmico, para avaliar a interferência de produtos de degradação na quantificação de HCTZ .

A degradação ácida, alcalina e neutra do fármaco foi realizada com a diluição da amostra em HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N e água purificada, respectivamente, sob refluxo a 60 °C por 2 h. A degradação oxidativa foi induzida armazenando a amostra diluída com peróxido de hidrogênio 3 % em temperatura ambiente por 24 h, protegida da luz. Os estudos de fotólise foram realizados após a exposição da HCTZ em forma de pó e diluída (água purificada, HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N), em uma câmara de fotoestabilidade sob luz UV a 254 nm por 72 h. Para investigar a estabilidade do fármaco em condições de stress térmico, uma camada de HCTZ em pó foi espalhada em uma placa de petri, mantida em estufa a 80 °C e analisada após 72 h (SINGH e BAKSHI, 2000). Após todos os procedimentos, as amostras sob teste foram neutralizadas, se necessário, e diluídas com fase móvel (30 µg/mL).

Como a clorotiazida (CTZ) é o principal produto de degradação da HCTZ, foi preparada uma solução (10 µg/mL) com esta substância para correlacionar com algum possível pico no cromatograma da HCTZ após os testes de stress.

2.2.8.4.3 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração em três dias diferentes. Para a construção de cada curva de calibração cinco concentrações padrão de HCTZ (10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL) foram preparadas em fase móvel. Foram realizadas três injeções de 20 µL de cada solução padrão para verificar a repetibilidade da resposta do detector em cada concentração. As áreas de pico dos cromatogramas foram plotadas *versus* as concentrações padrão para obter a curva de calibração. As cinco concentrações das soluções padrão foram submetidas à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação.

O LD e LQ foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração, conforme preconizado pela ICH (2005). O LD e LQ foram confirmados em uma análise experimental.

2.2.8.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do método de adição do padrão. Soluções de HCTZ matéria-prima (10 µg/mL) foram fortificadas com 3 concentrações conhecidas de padrão de referência: 5, 20 e 35 µg/mL para obter soluções de 15, 30 e 45 µg/mL, respectivamente. A recuperação do padrão adicionado foi determinada em triplicata e calculada como porcentagem de fármaco recuperado da formulação.

2.2.8.4.5 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada analisando 6 amostras contendo 30 µg/mL de HCTZ no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária as análises foram realizadas em três dias diferentes. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e a precisão foi expressa em porcentagem como desvio padrão relativo (DPR %). De maneira geral, para análises de formas farmacêuticas, DPR entre 1,0 e 2,0 % normalmente é considerado satisfatório (SHABIR, 2003).

2.2.8.4.6 Robustez

A robustez do método foi determinada através da análise de uma mesma amostra (30 µg/mL) modificando vários parâmetros do método, como: fluxo, coluna e temperatura do forno, além de variações na composição da fase móvel e pH. Para avaliar a estabilidade da HCTZ na fase móvel, uma solução amostra foi preparada, mantida em temperatura ambiente e analisada após 48 h.

2.2.8.4.7 Análise das suspensões farmacêuticas contendo HCTZ

Para a quantificação da HCTZ na forma farmacêutica, foram utilizados 6 lotes de cada suspensão contendo 2,5 mg/mL de HCTZ. O preparo das amostras seguiu a mesma metodologia previamente descrita para o preparo da solução amostra para validação. A solução foi filtrada e uma alíquota de 20 µL foi injetada para análise e a quantidade de fármaco na suspensão calculada versus o padrão de referência.

2.3 Caracterização microbiológica das suspensões

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Produção e Análises de Medicamentos (LAPAM) na UNIVALI, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Josiane Carvalho Vitorino.

2.3.1 Contagem de microrganismos viáveis totais

A contagem de microrganismos viáveis totais foi realizada pelo método de semeadura em profundidade (*pour plate*), onde uma alíquota de 10 mL de cada suspensão foi transferida para 90 mL de caldo *Leethen* (diluição 10⁻¹). Este meio líquido contém lecitina

de soja e polissorbato 80 em sua composição, atuando como diluente e inativante para o conservante presente na formulação. A partir desta diluição uma alíquota de 1 mL foi transferida para placas de petri estéreis em duplicata para cada meio de cultura, nas condições descritas na tabela 7. Foi realizado um controle negativo com os meios de cultura sem amostra.

Tabela 7. Metodologia da técnica de contagem de microrganismos viáveis totais

Microrganismo	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
Bactérias	Ágar Caseína Soja (CS)	30- 35 °C	48 – 72 h
Fungos	Ágar Sabourad-dextrose (SD)	20 – 25 °C	5 – 7 dias

Fonte: Farmacopéia Brasileira (1988); USP (2007).

Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias nas placas onde ocorreu crescimento, e o resultado foi expresso como UFC/mL.

2.3.2 Pesquisa de patógenos específicos

Conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira (1988), foram pesquisados os patógenos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus*.

A fim de proceder à pesquisa dos patógenos, a diluição (10^{-1}) preparada anteriormente foi incubada a 37 °C por 24 – 48 h para enriquecimento não seletivo. Particularmente para *Salmonella sp*, procedeu-se também ao enriquecimento seletivo em caldo selenito cistina pelo mesmo período.

Após o enriquecimento alíquotas foram transferidas, por estrias em superfície, para meios de cultura para isolamento e diferenciação, visando identificar o microrganismo. Os meios de cultura seletivos utilizados foram: ágar MacConkey (*E. coli*), ágar Cetrimide (*P. aeruginosa*), ágar Vogel Johnson (*S. aureus*) e ágar Verde Brilhante (*Salmonella sp*). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e o resultado foi positivo se ocorresse crescimento de microrganismos nos meios seletivos.

2.3.3 Teste do desafio

Devido ao procedimento trabalhoso e de alto custo, foram testadas apenas as formulações F2 e F4 (CMC-Na 0,6 % e HPMC 0,8 %), para verificar uma possível influência de cada polímero na eficácia do conservante.

O teste foi realizado seguindo protocolo descrito no suplemento 2 da Farmacopéia Americana (2007), sendo realizado nas suspensões com e sem conservante. A suspensão sem conservante foi utilizada como controle negativo para avaliar a viabilidade das células inoculadas e sua habilidade de crescimento no produto.

Um total de 4 cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) foram utilizadas individualmente: *Candida albicans* (ATCC N° 10231), *Escherichia coli* (ATCC N° 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N° 9027), e *Staphylococcus aureus* (ATCC N° 6538).

2.3.3.1 Padronização das cepas

A estimativa da concentração de cada inóculo foi realizada por medida turbidimétrica utilizando espectrofotômetro (600 nm) e determinada pelo método de contagem em placa para os microrganismos desafiados. Estes valores servem para calibrar o tamanho do inóculo usado no teste (USP 2007).

Os inóculos de uma cultura padrão recente foram incubados a 30 - 35 °C (24 h) e 20 - 25 °C (48 h) para culturas de bactérias e de *C. albicans*, respectivamente, utilizando como meio de cultura ágar nutritivo CS em tubo inclinado. Após o crescimento microbiano na superfície do ágar, foi acrescentado neste mesmo tubo 5 mL de tampão fosfato pH 7,2 estéril, homogeneizado e retirados os 5 mL da suspensão microbiana. Esta suspensão foi colocada em tubo estéril e agitada em vórtex por 2 minutos para completa homogeneização. Esta foi considerada a solução-mãe de onde foram feitas as diluições 1:5; 1:10; 1:20; 1:50 (*C. albicans*) e 1:10; 1:20; 1:50; 1:100 (demais microrganismos). Cada diluição foi analisada em espectrofotômetro para verificar a densidade óptica dos microrganismos suspensos. Após este procedimento, foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada diluição para a contagem de microrganismos pelo método de semeadura em profundidade. A diluição que correspondeu à contagem microbiana de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC/mL foi utilizada como inóculo padrão. As suspensões padronizadas foram utilizadas imediatamente.

2.3.3.2 Procedimento do teste

A partir da diluição de microrganismo selecionada foi retirada uma alíquota 200 µL que foi adicionada ao frasco contendo 20 mL de cada suspensão farmacêutica analisada. Cada inóculo foi acrescentado em um frasco estéril de suspensão separadamente. Os frascos em teste foram incubados a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegidos da luz. Alíquotas (1000 µL) das amostras contaminadas foram pipetadas imediatamente após a inoculação (tempo zero) e após 7, 14, 21 e 28 dias, sendo utilizadas para determinar a redução da viabilidade celular através do método de contagem em placa em ágar CS para bactérias e DB para *C. albicans*.

É essencial extinguir qualquer resíduo de atividade do conservante no produto no momento da contagem em placa, para realizar uma contagem exata de microrganismos viáveis. Para isto, foi utilizado caldo *Leithen* como diluente, pois este contém em sua composição lecitina de soja e polissorbato 80, que são inativantes químicos do conservante benzoato de sódio.

As placas de petri foram incubadas a $30 - 35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h (bactérias) e $20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias (*C. albicans*). Para expressão dos resultados as contagens foram realizadas nas diluições onde houve crescimento entre 30 e 300 colônias para bactérias e 15 a 150 colônias para fungos.

2.3.3.3 Critério de aceitação

Segundo a Farmacopéia Americana (2007), para a categoria 3 (produtos com base aquosa), o conservante é considerado eficiente se não ocorrer nenhum aumento no número de *C. albicans*, e se o número de bactérias for reduzido não menos que 1.0 ciclo log (90 %) do número inicial inoculado em 14 dias, e nenhum aumento ocorrer do 14° ao 28° dia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das suspensões

3.1.1 Determinação das características organolépticas

Todas as formulações apresentaram-se turvas devido ao material suspenso, com ausência de odores e com sabor ácido característico.

3.1.2 Determinação do pH

O pH é uma das constantes físico-química mais importante na caracterização de formulações líquidas, pois através de sua determinação é possível avaliar a velocidade de hidrólise de fármacos (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Segundo Mollica e colaboradores (1971), a hidrólise da HCTZ envolve uma cinética reversível em que a velocidade da reação é influenciada pelo pH, mas a constante de equilíbrio é independente do pH de 1,5 a 8,2. Nesta faixa de pH o equilíbrio favorece a HCTZ. Em soluções muito alcalinas ou na presença de reagentes que reagem com formaldeído, a reação é deslocada para a direita e a hidrólise é completa. O perfil de pH é complexo, não podendo ser explicado pela ionização dos reagentes, e revela máxima velocidade de hidrólise em pH 7, e mínima em pH 2,5 e 11,5. Desta forma, o pH das quatro formulações testadas foi ajustado para 3,3, onde o fármaco apresenta adequada estabilidade.

3.1.3 Potencial zeta

O potencial zeta é a medida experimental mais próxima do potencial da superfície da partícula, sendo medido por eletroforese. Nesta técnica é avaliada a mobilidade eletroforética, onde a carga elétrica não é medida diretamente, mas após a aplicação de um campo elétrico que faz com que as partículas movimentem-se em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico possa ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN, 2007).

Em suspensões farmacêuticas, polímeros iônicos podem, dependendo da carga das partículas, produzir sistemas floculados ou defloculados. Se as partículas tiverem carga oposta ao polímero, ocorrerá neutralização de cargas e aproximação das partículas. Se as

partículas suspensas tiverem uma densidade de carga bastante elevada, ocorrerá defloculação (AULTON, 2005; SINGH, 2005). Além disto, estes polímeros apresentam a vantagem de ionizar em solução aquosa, podendo agir simultaneamente por meio de efeitos eletrostáticos e estéricos, sendo conhecidos como polieletrólitos (AULTON, 2005). Desta forma, o potencial de superfície será determinado pela atividade destes íons e, se o grau de adsorção não mudar, permanecerá constante durante a interação com outras partículas. A interação, então, acontece em potencial de superfície constante (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

De acordo com Vasconcelos e colaboradores (2004), o mecanismo envolvido na floculação de suspensões por polieletrólitos é devido à formação de pontes entre os polímeros, desta forma ocorre adsorção da cadeia polimérica simultaneamente na superfície de várias partículas. Outros autores estudando comportamento de CMC-Na e HPMC em diferentes suspensões concluíram que polímeros aniônicos atuam por interações eletrostáticas e estéricas, enquanto polímeros não-iônicos atuam somente por meio de interação estérica (DURO et al., 1998; PAWLIK, 2005).

Os resultados de potencial zeta das formulações podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8. Potencial zeta das formulações desenvolvidas

Formulações	Potencial zeta (mV) ^a	DPR (%) ^b
F1	- 21,1	1,5
F2	- 22,6	1,6
F3	- 1,97	2,9
F4	- 2,01	2,3

^a média de três determinações

^b Desvio padrão relativo

Dados da literatura mostram que uma interação eletrostática e/ou estérica significativa para manter as partículas sem agregação é conseguida com valores de potencial zeta maiores de ± 30 mV. Abaixo deste valor pode ocorrer algum tipo de interação entre as partículas levando à floculação (CAI; ODE; MURAKAMI, 2006).

A HCTZ é um ácido polifuncional com valores de pKa de 8,75 e 9,88 (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2007). Portanto, em pH < 6 a HCTZ é uma molécula desprovida de carga elétrica. Em pH > 10 é um diânion, enquanto que na faixa de pH de 6 a 10 existe uma mistura de formas sem carga, monoaniônica e dianiônica (CUDINA et al., 2005).

Com o uso da CMC-Na (F1 e F2), que é um polímero aniônico, adsorvido nas partículas desprovidas de carga da HCTZ, o potencial zeta será resultado da carga superficial negativa do polímero. Desta forma, estas formulações encontram-se parcialmente floculadas devido aos efeitos eletrostático e estéricos do polímero adsorvido na superfície das partículas, causando certo grau de repulsão devido à carga negativa, porém formando pontes entre as partículas através de sua longa cadeia dando origem aos flóculos.

De acordo com Phenrat e colaboradores (2007) a magnitude de repulsão eletrostática entre as partículas depende da densidade de carga do polieletrólito adsorvido na superfície da partícula, e da concentração utilizada. Assim, nas suspensões analisadas, o grau de repulsão provocado pelo polieletrólito não é muito acentuado, pois a formulação com um pH ácido não leva a dissociação total dos grupamentos carboxílicos do polímero aniônico. O potencial zeta mantém-se negativo, pois não existem cargas opostas para neutralizar as cargas dos polímeros adsorvidos. Sendo assim, nas formulações F1 e F2 verifica-se uma floculação controlada, ocorrendo um equilíbrio de forças de atração e repulsão levando a formação de sedimento frouxo e de fácil redispersão.

Por outro lado nas formulações desenvolvidas com HPMC (F3 e F4), que é um polímero não-iônico, o potencial zeta é praticamente nulo, devido à ausência de cargas elétricas tanto do polímero quanto da partícula. A aproximação de duas partículas com camadas poliméricas adsorvidas resulta em uma interação estérica quando as camadas se sobrepõem, pois como o polímero é muito denso não deixa espaços na superfície (GONCHARUK et al., 2001). Neste caso, com a formação de uma camada de hidratação ao redor de cada partícula, não ocorre a formação de ligações cruzadas entre as partículas adjacentes. A adsorção de cada molécula do polímero é sobre uma única partícula, formando uma barreira hidrofílica ao redor de cada partícula impedindo a floculação (ORTEGA et al., 1997; FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Devido a estes fatores, nas formulações F3 e F4 foi verificada a formação de *caking*, pois as partículas não sofrem o mecanismo de floculação controlada devido ao efeito protetor do polímero, ocorrendo a formação de um sistema defloculado, sedimentando de forma individual e agregando-se no fundo do recipiente devido às forças de atração de *Van der Waals*, de modo que as menores partículas preenchem os espaços deixados pelas maiores, o que torna o sedimento compacto.

3.1.4 Tamanho de partícula

O tamanho da partícula é um dos parâmetros mais importantes na estabilidade física de suspensões, que juntamente com a viscosidade, são os parâmetros mais fáceis de controlar (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; WONG et al., 2006).

Na maioria das suspensões farmacêuticas o diâmetro das partículas é de 1 a 50 μm , sendo que é mais vantajoso suspender fármacos que tenham uma faixa de tamanho estreita (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). O uso de polímeros que adsorvam essas partículas na sua superfície pode prevenir o crescimento de cristais (AULTON, 2005).

Quando uma partícula é dispersa em meio aquoso, as cargas elétricas presentes na superfície ou no meio influenciam sua dispersão ou agregação, o que depende do pH. Desta forma, a análise do tamanho das partículas informa sobre o estado de dispersão do pó nas condições estabelecidas (SINGH et al., 2005).

A microscopia óptica é uma das técnicas mais utilizadas no desenvolvimento farmacêutico. É geralmente aplicada como método de medida absoluto, onde as partículas são observadas individualmente para determinação de seu tamanho e forma (SHEKUNOV et al., 2006).

Foram verificados os diâmetros de um total de 156 partículas para cada formulação, como forma de padronizar a análise, diminuir o desvio padrão e obter uma melhor distribuição de tamanho. As fotomicrografias da HCTZ antes da trituração foram obtidas utilizando um aumento de 100 x. As suspensões de HCTZ dispersas em solução contendo CMC-Na foram analisadas com um aumento de 400 x, enquanto que nas suspensões dispersas em HPMC foi utilizado um aumento de 1000 x. Esta diferença ocorreu em decorrência dos diferentes diâmetros encontrados para as amostras analisadas. Na figura 13 podem ser visualizadas as fotomicrografias das partículas nas diferentes formulações, onde pode-se observar a forma esférica irregular das mesmas. A falta de nitidez das fotomicrografias C e D é devido ao maior aumento na lente utilizado em comparação com as fotomicrografias A e B.

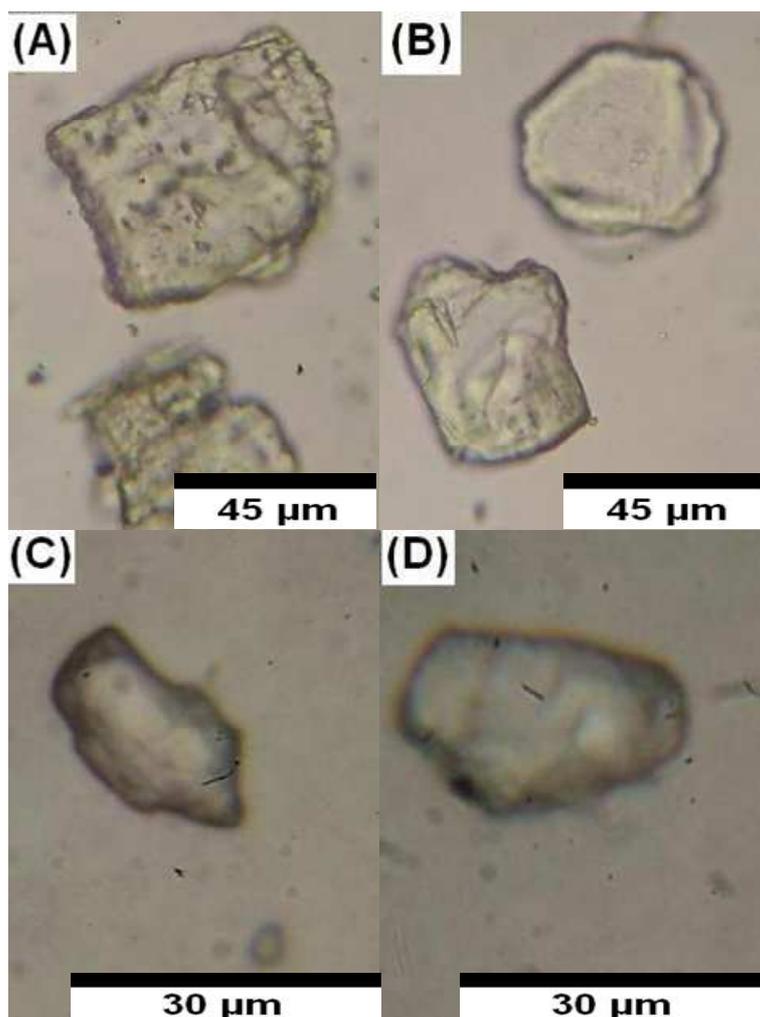


Figura 13. Fotomicrografias das partículas de HCTZ suspensas (A) F1 (aumento de 400 x); (B) F2 (aumento de 400 x); (C) F3 (aumento de 1000 x); (D) F4 (aumento de 1000 x).

A partir da média dos diâmetros determinados no *software Size Meter* foram construídos gráficos relacionando o número de medidas com a distribuição de tamanho das partículas em suspensão.

As formulações F1 e F2 apresentaram partículas com cerca de 43 µm, maiores do que as partículas das formulações F3 e F4. Isto provavelmente se deve à aglomeração causada pelo polieletrólito CMC-Na levando a floculação. Os gráficos de distribuição de tamanho para suspensões de HCTZ dispersas em solução de CMC-Na podem ser visualizados na figura 14.

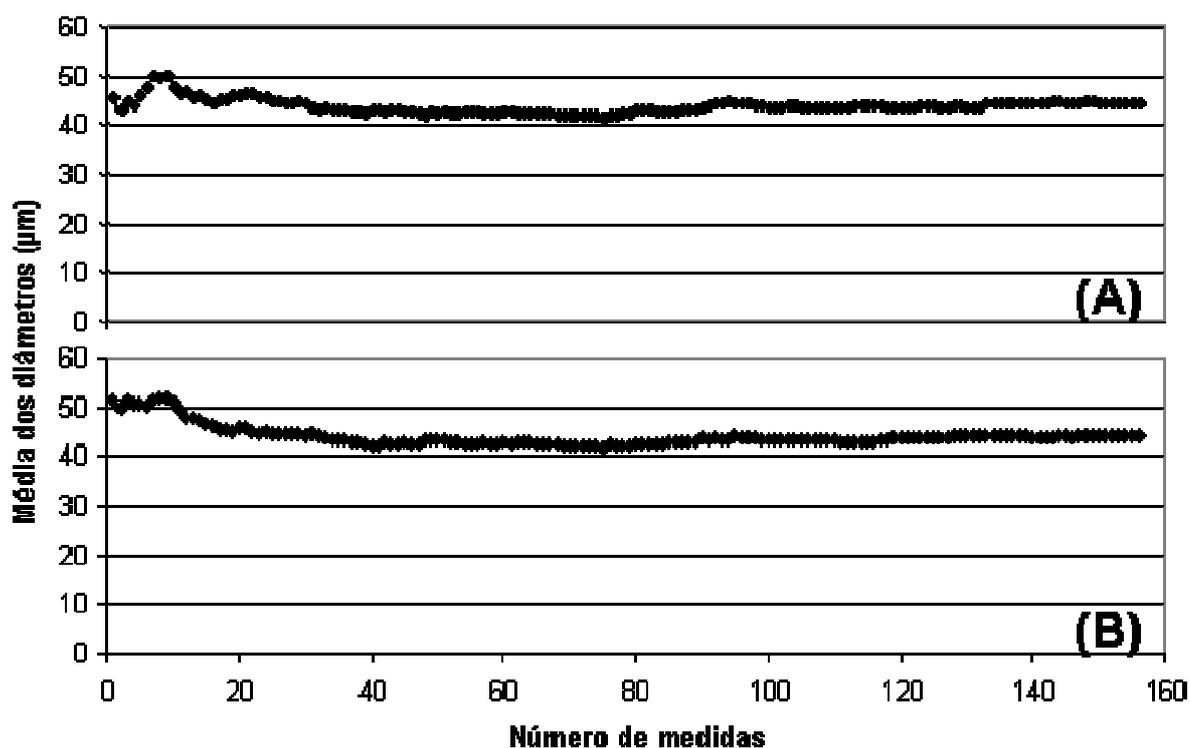


Figura 14. Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ (A) F1; (B) F2

Situação semelhante foi descrita por Tkachenko e colaboradores (2006), onde suspensões de dióxido de titânio agregadas apresentaram um maior diâmetro do que as partículas trituradas em pó. Goncharuk e colaboradores, (2000) verificaram um aumento no diâmetro médio de partículas de sílica em suspensões floculadas com PVP.

Por outro lado, nas formulações F3 e F4 foram encontradas partículas de diâmetros menores do que as partículas floculadas das formulações F1 e F2, como pode ser visualizado na figura 15.

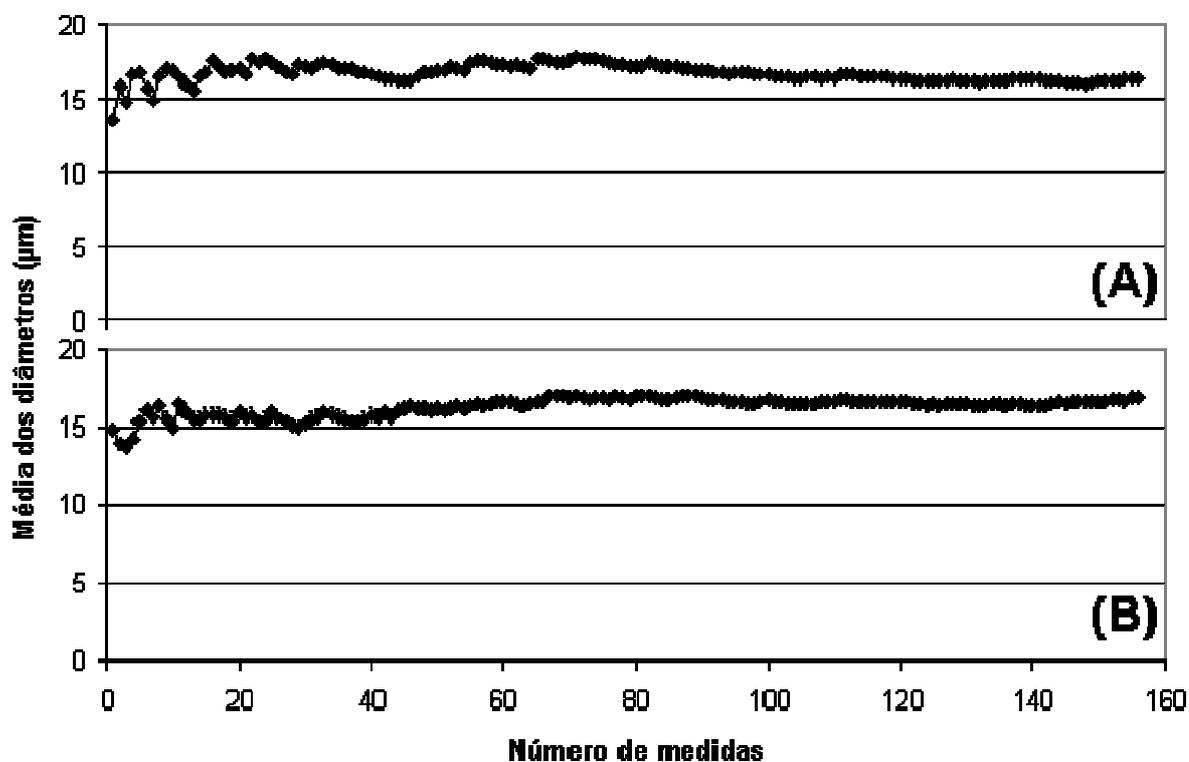


Figura 15. Distribuição de tamanho das partículas de HCTZ (A) F3; (B) F4

Como nas suspensões contendo HPMC as partículas estão defloculadas, estas não estão agregadas, e o diâmetro encontrado é de uma partícula individual. Este fato foi observado por Savitskaia e colaboradores (2005), comparando suspensões de fibra de carvão contendo CMC-Na e suspensões contendo poliacrilamida. Os autores constataram que a CMC-Na evitou a agregação das partículas, mantendo-as dispersas e com menor tamanho de partícula em comparação com poliacrilamida.

As partículas de HCTZ na forma de pó foram analisadas antes da trituração em gral de porcelana para a preparação da suspensão. De acordo com os resultados descritos na tabela, pode-se perceber que o diâmetro da HCTZ antes da trituração é maior do que após a técnica de preparo das suspensões, sendo assim pode-se confirmar que a técnica de trituração em gral é eficiente na redução do tamanho das partículas. Na tabela 9 estão resumidos os diâmetros médios encontrados neste estudo.

Tabela 9. Diâmetro médio das partículas de HCTZ.

Amostra	Diâmetro médio^a (µm)	DPR^b (%)
HCTZ pó	274,7	3,3
F1	43,7	3,3
F2	44,1	3,9
F3	16,7	3,6
F4	16,3	3,7

^a média de 156 determinações

^b Desvio padrão relativo

3.1.5 Volume de sedimentação e Redispersibilidade

Como a redispersibilidade é uma das considerações mais importantes para a aceitabilidade da suspensão e o sedimento formado deve ser facilmente disperso sob agitação moderada para originar um sistema homogêneo, a medição do volume de sedimentação e a facilidade com que a redispersão ocorre são duas das técnicas comuns para avaliação de suspensões (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Para estudar a sedimentação das suspensões, o volume de sedimentação foi determinado em função do tempo. Este teste é utilizado para suspensões mantidas em uma condição estacionária, onde as partículas sedimentam somente no sentido vertical devido à ação da força da gravidade (SHOJAEIA e AREFINIA, 2006). Em outro estudo, Yoshida e colaboradores (2005) desenvolveram uma metodologia para análise da sedimentação das partículas através de agitação horizontal, verificando assim possíveis problemas causados pelo transporte das suspensões.

A razão entre o volume final de sedimento e o volume total é o parâmetro utilizado para verificar a estabilidade física da suspensão, sendo que quanto maior for o valor da razão (F) mais elevado é o grau de floculação (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

De acordo com a tabela 10, pode-se observar que as formulações F3 e F4 apresentaram menor volume de sedimentação, sendo que após 24 h o sedimento formado é compacto, característico de um sistema defloculado, enquanto que nas formulações F1 e F2 o sedimento formado tem um volume final maior devido à estrutura das partículas na forma de flóculos. Verifica-se também que nas formulações F3 e F4 as partículas levaram um tempo maior para sedimentar em comparação às suspensões F1 e F2, fato que pode ser explicado pelo menor tamanho de partícula encontrado naquelas formulações, que

permanecem suspensas por mais tempo, enquanto que as partículas floculadas das formulações F1 e F2 apresentam uma maior estrutura, sedimentando mais rapidamente.

Tabela 10. Volume de sedimentação das suspensões desenvolvidas.

Tempo (h)	Volume de sedimentação (F) ^a ± DPR ^b (%)			
	F1	F2	F3	F4
2	0,95 ± 0,6	0,95 ± 0,2	1 ± 0	1 ± 0
4	0,75 ± 0,7	0,85 ± 0,3	0,95 ± 0,5	0,95 ± 0,6
6	0,5 ± 0,6	0,65 ± 0,8	0,80 ± 0,3	0,80 ± 0,6
8	0,2 ± 1,7	0,25 ± 0,8	0,65 ± 0,8	0,65 ± 1
24	0,08 ± 1,6	0,11 ± 1,8	0,001 ± 0	0,001 ± 0

^a média de três determinações

^b Desvio padrão relativo

É visível que as formulações contendo CMC-Na com menor quantidade de polímero (F1) apresentam sedimentação mais rápida do que F2, devido à menor resistência ao movimento das partículas provocada por uma menor viscosidade do meio, fato que foi descrito por Gabriels e Plaizier-Vercammenl (2004) em estudo com goma xantana. Ainda de acordo com estes autores, para se obter uma suspensão aceitável o valor de F deve ser igual a 0,9 na primeira hora de sedimentação, e pelo maior tempo possível.

Na figura 16 estão demonstradas as quatro formulações após sedimentação de 24 horas. Através deste estudo, foi evidenciado que a formação de flóculo forma uma estrutura sedimentar mais alta e solta (A e B), ao contrário do sistema defloculado produzido pelo HPMC (C e D).

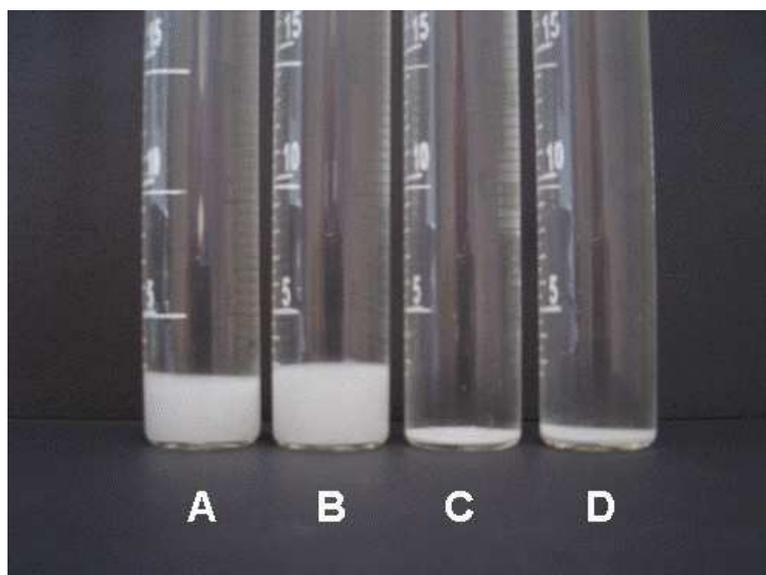


Figura 16. Sedimento formado após 24 horas de teste: (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.

Relacionado ao volume de sedimentação está o principal fator que determina a precisão de cada dose de uma suspensão farmacêutica, que é a correta homogeneização da dispersão no momento do uso. A redispersão após a sedimentação das partículas apresenta dificuldades para ser analisada em laboratório em condições similares às encontradas no uso terapêutico. Na prática, suspensões são redispersas por agitação manual do frasco, entretanto existem poucos estudos indicando o tempo e intensidade de agitação necessários para uma boa homogeneização (DEICKE e SUVERKRUP, 1999).

Os compêndios oficiais especificam que após a sedimentação das partículas, uma suspensão deve se redispersar com agitação, porém não apresentam um teste padronizado. Nos últimos 40 anos, vários métodos têm sido desenvolvidos para analisar a redispersão de suspensões, entretanto são poucos os que levam em consideração o fator humano. Yasueda e colaboradores (2004) padronizaram o uso de um rotor onde as amostras foram mantidas em rotação a 60 RPM até completa redispersão. Da mesma forma, Chang e colaboradores (2002) utilizaram um agitador com velocidade de 300 stokes/min, velocidade esta que simula a movimentação de um braço humano no momento da agitação. Deicke e Suverkrup (1999, 2000) através de cálculos matemáticos realizaram o perfil de aceleração de 79 voluntários utilizando um sensor conectado ao fundo dos frascos. Os autores concluíram que deve ser utilizada uma frequência de 4,2 Hz com uma amplitude de 5 cm durante 3 s, para mimetizar a aceleração do braço humano. Por outro lado, Terayama e colaboradores (2004) e Kittipongpatana e colaboradores (2006) utilizaram a medida manual, com agitação constante do frasco a 180° até homogeneização. Desta forma, neste estudo o teste manual foi o escolhido devido à praticidade e para mimetizar uma condição real.

O ensaio de redispersibilidade apresentou diferenças entre as formulações contendo CMC-Na e HPMC. Isto pode estar associado ao fato de que as suspensões contendo HPMC (F3 e F4) apresentaram o fenômeno de *caking*, com sedimento compacto que precisou de uma agitação vigorosa para ser redisperso. Isto não foi observado nas formulações contendo CMC-Na (F1 e F2), onde foi observado anteriormente o fenômeno de floculação controlada com formação de sedimento frouxo, desta forma, com agitação suave o tempo necessário para a completa redispersão do sedimento foi menor, conforme tabela 11.

Tabela 11. Ensaio de redispersão das suspensões desenvolvidas

Formulação	Tempo (s) ^a	DPR ^b (%)
F1	12,6	2,5
F2	13,3	2,3
F3	61,3 av	1,5
F4	61,9 av	1,3

^a média de três determinações

^b Desvio padrão relativo

av = agitação vigorosa

Terayama e colaboradores (2004) e Yasueda e colaboradores (2004), analisando o comportamento de suspensões contendo HPMC em diferentes concentrações, verificaram a formação de *caking* com concentrações maiores de polímero, e conseqüentemente, o sedimento formado não redispersou facilmente com agitação. Segundo Deicke e Suverkrup (1999), um maior tempo de agitação não é capaz de redispersar suspensões que apresentem a formação de *caking* se a intensidade não for alta o bastante para quebrar a estrutura compactada. Esta situação torna-se crítica quando os pacientes são crianças ou idosos, que precisam de uma formulação fácil de redispersar para garantir uma dosagem precisa do medicamento.

Outro inconveniente nas formulações F3 e F4 foi a formação de espuma após agitação, o que é também um fator que pode influenciar negativamente na precisão da dose.

Desta forma, as formulações F1 e F2 são as preferíveis devido à rápida distribuição do agregado de menos de 15 s.

3.1.6 Avaliação do comportamento reológico

A análise reológica é utilizada para determinar a viscosidade da formulação. O estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria é chamado reologia (AULTON, 2005).

Frequentemente, com suspensões floculadas as partículas depositam-se muito rapidamente devido a maior estrutura do floco, o que impede a precisão da dose e produz um sobrenadante antiestético. A velocidade de sedimentação pode ser reduzida aumentando a viscosidade do meio dispersante, com o uso de agentes espessantes, favorecendo a suspensão da fase dispersa (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Em suspensões defloculadas, a rede tridimensional formada pelo polímero aprisiona partículas

em repouso, e sua sedimentação é retardada. A rede do gel é destruída durante a agitação, de forma que a administração torna-se mais fácil (AULTON, 2005).

Os polímeros derivados de celulose são os mais utilizados para controlar a viscosidade de suspensões farmacêuticas, atuando devido a redes estruturais formadas através de interações iônicas e pontes de hidrogênio (YANG et al., 2007). Os aglomerados podem ser considerados unidades significativamente maiores que as partículas primárias que as originam e, por isso, causam maior perturbação das linhas de fluxo do líquido durante o escoamento da suspensão. Para polímeros com cadeias ramificadas a probabilidade de se estabelecerem ligações entre as cadeias aumenta (DURO et al., 1998; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; LI; HOU; ZHU, 2007).

Os viscosímetros rotacionais de cilindro concêntrico, apesar de possuírem um custo mais elevado, são os mais utilizados na avaliação do comportamento reológico de suspensões. Esse equipamento, basicamente, consiste em dois cilindros concêntricos, onde é aplicada uma taxa de cisalhamento na suspensão e avalia-se a tensão de cisalhamento. Geralmente um cilindro gira em torno do eixo, enquanto o outro é fixo. As principais fontes de erro no viscosímetro rotacional são: o efeito da parte inferior do rotor, o deslizamento das partículas na parede do rotor, a migração e a sedimentação das partículas durante o ensaio (FERREIRA et al., 2005). Para evitar estes problemas foi realizado o pré-tratamento das amostras para quebrar a microestrutura da suspensão, sob um cisalhamento constante de 100s^{-1} durante 120, e então permanecendo em um período de repouso de 180 s.

Após o pré-tratamento, as curvas de fluxo foram obtidas submetendo-se as amostras à velocidade de cisalhamento crescente, o que provocou uma destruição da estrutura do sistema. Este sistema, uma vez desorganizado, tende a se reorganizar. O tempo em que ocorreu esta reorganização é obtido pelas leituras em velocidades decrescentes de tensão de cisalhamento. Sendo assim, para todas as formulações analisadas com o aumento da taxa de cisalhamento ocorreu uma diminuição da viscosidade em maior ou menor grau, sendo que com a diminuição da taxa de cisalhamento as suspensões voltaram a sua viscosidade inicial devido à característica de fluido não-newtoniano pseudoplástico, que foi conferida pelos agentes poliméricos utilizados (figura 17). Este comportamento de fluxo já é bem descrito na literatura para estes polímeros (CANCELA; ALVAREZ; MACEIRAS, 2005; DIAZ e NAVAZA, 2003; ZHANG e KONG, 2006; WESTRA, 1989; YASAR et al., 2007).

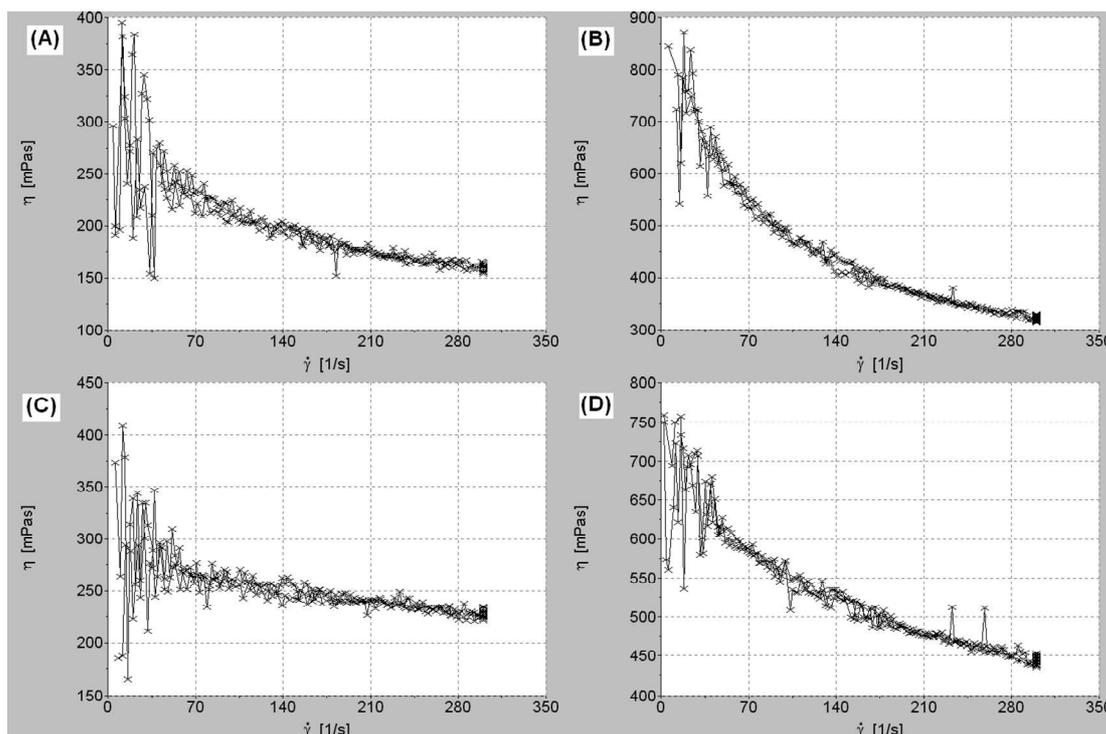


Figura 17. Reogramas da viscosidade versus taxa de cisalhamento (0 a 300s^{-1} ; 300 a 0s^{-1} ; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.

Considerando aspectos de estrutura molecular, observa-se que a maioria das substâncias geradoras de sistemas pseudoplásticos é composta por longas cadeias poliméricas lineares que, quando hidratadas tendem a estruturar-se de acordo com o sentido da força de cisalhamento aplicada (VASCONCELOS et al., 2004). Quando em altas taxas de cisalhamento, as forças hidrodinâmicas exercidas pelo fluxo tornam-se maiores e os “flocos” são destruídos, sendo que a água aprisionada em seu interior é gradualmente libertada para auxiliar no fluxo das partículas, ocorrendo uma orientação do polímero desestruturado na direção do fluxo. Isto faz com que a resistência ao fluxo diminua, e conseqüentemente diminua a viscosidade da suspensão (CLASEN e KULICKE, 2001; MORRISON, 2001). Em adição a esses efeitos, existem grupamentos OH nas cadeias dos polímeros que formam pontes de hidrogênio entre eles, entretanto, como estas ligações não são estáveis, podem ser quebradas no cisalhamento diminuindo a viscosidade (YANG; ZHU, 2007; YASAR; TOGRUL; ARSLAN, 2007).

A viscosidade pode apenas ser calculada como a inclinação da tangente à curva em um ponto específico. Tais viscosidades são chamadas viscosidades aparentes e têm significado apenas se indicarmos a velocidade de cisalhamento na qual a determinação foi feita. Uma vez que seriam necessárias várias viscosidades aparentes para caracterizar um material pseudoplástico, a representação mais satisfatória é feita por meio de toda a curva de fluxo. Contudo, nota-se frequentemente que a tensões de cisalhamento muito elevadas a

curva de fluxo tende a linearidade, indicando que foi atingido um valor mínimo de viscosidade. Quando este for o caso, essa viscosidade mínima é um parâmetro útil de classificação (AULTON, 2005).

Nas formulações testadas, este valor mínimo foi utilizado como forma de atribuir um valor médio de viscosidade aparente para cada formulação. Para as formulações F1 e F2 o valor de viscosidade aparente a 300 s^{-1} e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ foi de $161,6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 1,5$ e $322 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2,5$, respectivamente. Para as formulações F3 e F4 o valor encontrado nas mesmas condições foi $230,3 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 0,57$ e $441,6 \text{ mPa}\cdot\text{s} \pm 2,8$, respectivamente.

Pode-se observar que para ambos os polímeros, quanto maior a concentração de sólidos, maior é a barreira ao escoamento do fluido, pois a dificuldade imposta pelas partículas ao fluxo do líquido ao seu redor aumenta a viscosidade da suspensão. Além disso, a viscosidade é função das forças de interação que restringem o movimento molecular. Estas forças são afetadas pela mudança na temperatura e concentração de polímeros (BENCHABANE e BEKKOUR, 2006; DAPIA et al., 2005).

Para descrever a reologia de sistemas não-newtonianos foi utilizado o modelo da lei da força. A dedução do valor de n , informa sobre o grau de pseudoplasticidade. De acordo com os resultados, todas as formulações analisadas apresentaram um grau de pseudoplasticidade (n) < 1 , confirmando o comportamento não-newtoniano e pseudoplástico visualizado na figura 17. Para as formulações F1 e F2, os valores de n encontrados foram 0,5822 e 0,4529, respectivamente, enquanto que para as formulações F3 e F4 os valores de n foram 0,7443 e 0,6165 respectivamente. Nas formulações contendo menor concentração de polímeros (F1 e F3), observam-se valores de n mais próximos de 1 do que nas formulações contendo concentrações maiores de polímeros (F2 e F4). Este fato foi observado por Cancela e colaboradores (2005), que testando concentrações de CMC-Na de 0,5 a 2 %, encontraram dependência do índice de fluxo com a concentração. Quanto menor a concentração de CMC-Na mais o n se aproxima de 1 e a curva tende a linearidade adquirindo características newtonianas.

Esta relação do valor de n com a concentração de polímero também foi verificada por Clasen e Kulicke (2001) para o HPMC. Em outro estudo, Maltese e colaboradores (2005) analisando suspensões contendo 0,8 % de HPMC para uso ocular verificaram um índice de fluxo menor que 1, confirmando a pseudoplasticidade do polímero.

Com relação à tixotropia, a observação dos reogramas obtidos permite afirmar que nenhuma das formulações em teste apresenta caráter tixotrópico, pois não possuem área de histerese, sendo assim, a ruptura e a formação de ligações entre os flocos não são dependentes do tempo. Desta forma, a recuperação da estrutura é imediata, os ramos ascendente e descendente dos reogramas são idênticos, sobrepondo-se.

De acordo com Ghannam e Esmail (1997) o comportamento tixotrópico depende da concentração de CMC-Na na formulação, sendo que a área de histerese aumenta com concentrações maiores de polímero. Zhang e colaboradores (2006) utilizando 2,5 % de CMC-Na obtiveram um sistema pseudoplástico não tixotrópico. Por outro lado, Bournonville e Nzihou (2002), analisando suspensões aquosas contendo resíduos de cinzas verificaram dois comportamentos distintos dependentes da concentração de sólidos, um pseudoplástico e outro pseudoplástico tixotrópico. A diferença entre eles é que o tempo para quebra da estrutura formada é finito e mensurável no material tixotrópico, enquanto que no material pseudoplástico não é detectável.

Desta forma, confirma-se que o comportamento de fluxo e o grau de tixotropia das suspensões analisadas dependem da concentração de polímero, sendo que as suspensões contendo maiores concentrações de polímeros (F2 e F4) apresentaram os resultados mais satisfatórios.

3.1.7 Doseamento de HCTZ na suspensão

3.1.7.1 Desenvolvimento do método

Para obter a melhor condição cromatográfica, a fase móvel foi otimizada para melhor seletividade e sensibilidade em um curto tempo de separação. A melhor assimetria de pico foi alcançada com um fluxo de 1,3 mL/min com temperatura de coluna de 40 °C. O pH ácido da fase móvel foi utilizado para manter a estabilidade da HCTZ durante a análise (HERTZOG et al., 2002). Nas condições otimizadas, o tempo de retenção da HCTZ foi cerca de 3,5 min, e um cromatograma típico obtido pelo método pode ser visualizado na figura 18 (A).

Os resultados da conformidade do sistema estão descritos na tabela 12 e mostram que o sistema e o procedimento são capazes de gerar dados confiáveis.

Tabela 12. Resultados do teste de conformidade do sistema

Parâmetro	Mínimo	Máximo	DPR ^a (%)	Resultado
Assimetria	1,17	1,17	0,38	Conforme
Pratos teóricos	9557	9982	1,11	Conforme
Tempo de retenção	3,556	3,564	0,08	Conforme
Área	502289	507958	0,57	Conforme

^a Desvio padrão relativo

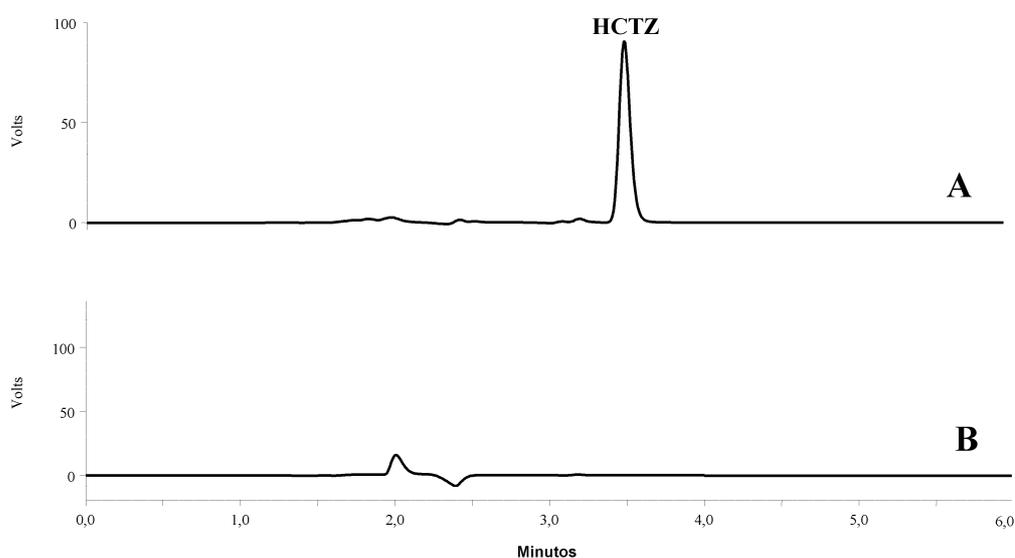


Figura 18. Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio 0,1 M:acetonitrila (70:30 v/v) ajustada a pH 3,0 sob fluxo de 1,3 mL/min e detecção UV a 254 nm. (A) Suspensão de HCTZ (F2) (30 µg/ml); (B) Suspensão placebo

3.1.7.2 Validação do método

De acordo com os ensaios de caracterização das formulações, a suspensão contendo CMC-Na 0,6 % (F2) foi a que apresentou maior estabilidade física, sendo assim, foi a formulação de escolha para a realização da validação do método para doseamento.

3.1.7.2.1 Especificidade

Os cromatogramas da solução amostra (A) da solução placebo (B) estão apresentados na figura 18 e mostram que não houve interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico da HCTZ.

Adicionalmente, a especificidade foi confirmada através dos estudos de *stress*. Estes estudos foram realizados para validar a capacidade do método em identificar fatores que podem ter impacto na estabilidade do fármaco.

Através dos resultados de hidrólise ácida, básica e neutra, verificou-se que o teor de HCTZ diminuiu e um pico adicional foi observado no tempo de retenção de 3,2 min (figura 19 C, D, E, respectivamente). A identificação deste pico adicional foi realizada mediante injeção de uma solução padrão de CTZ (10 µg/mL), que resultou em um pico com o mesmo tempo de retenção, sugerindo a identidade da CTZ (figura 19 B). A suspeita de que a CTZ possa ser formada durante a degradação da HCTZ foi baseada em informações da literatura de que a CTZ possa estar presente como um contaminante sintético ou produto de degradação da HCTZ (LUSINA et al., 2005). A degradação da HCTZ em condições ácidas e básicas foi de 17 e 18 %, respectivamente. A condição neutra teve degradação mais significativa, com 25 % de fármaco degradado após refluxo de 2 h (figura 19 E). Isto pode ser explicado pelo perfil de pH complexo da HCTZ, que revela máxima velocidade de hidrólise em pH 7 (MOLLICA et al., 1971).

Em condições oxidativas, a HCTZ degradou 9 %, e dois produtos de degradação foram detectados, CTZ e outro que não foi identificado (figura 19 F).

A partir dos resultados dos estudos de fotoestabilidade, foi observado que o fármaco no estado sólido foi comparativamente mais fotoestável do que em solução, com somente 0,6 % de degradação. Em soluções ácidas, alcalinas e neutras foi observado 5, 8 e 6 % de degradação após 72 h de exposição à luz, respectivamente. Em condições de *stress* térmico não foi observada nenhuma alteração no teor, e nenhum pico adicional foi detectado após 72 h (dados não mostrados).

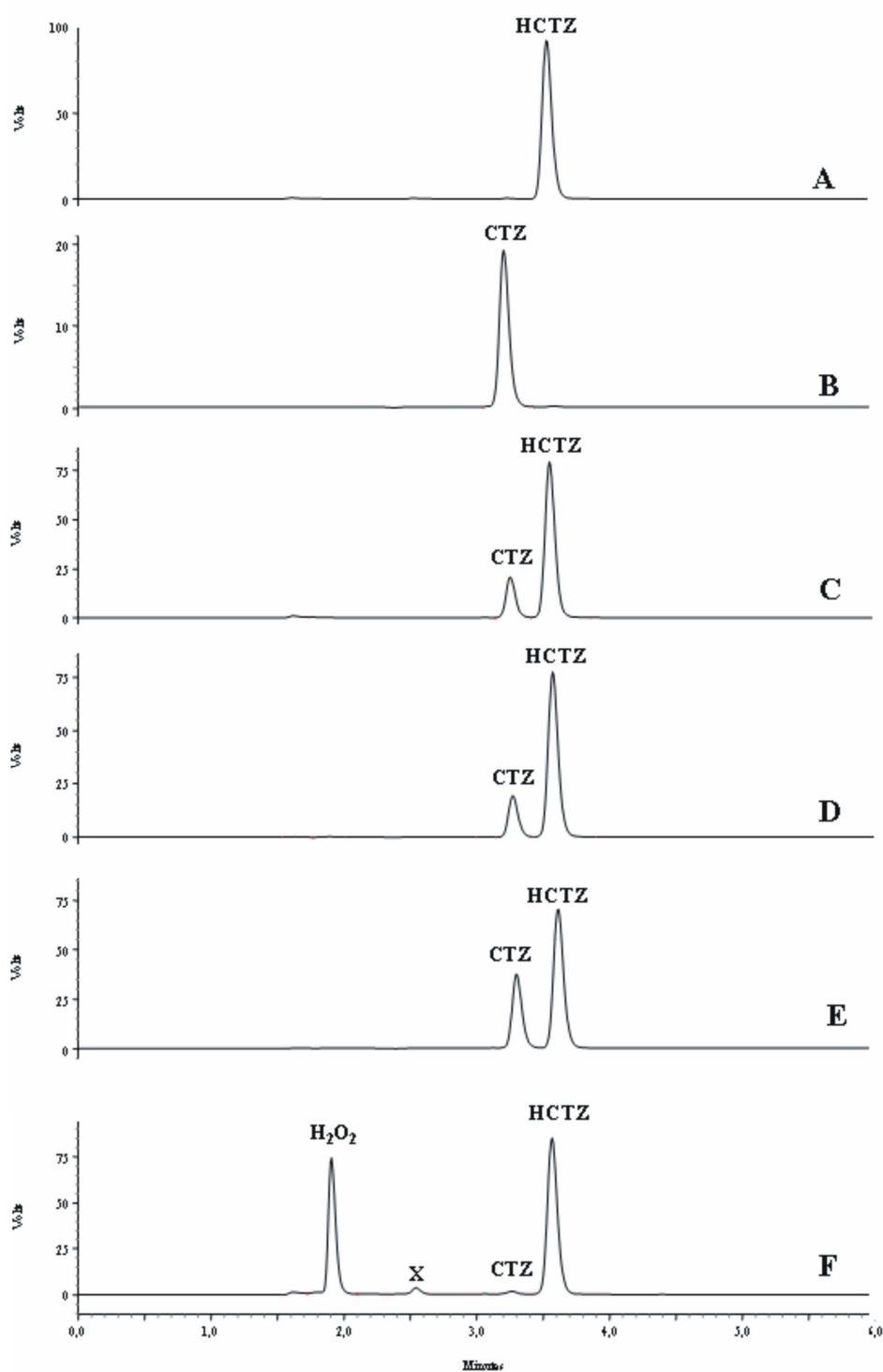


Figura 19. Cromatogramas obtidos no estudo de stress utilizando fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio 0,1 M:acetonitrila (70:30 v/v) ajustada a pH 3,0 sob fluxo de 1,3 mL/min e detecção UV a 254 nm. (A) HCTZ padrão (30 µg/ml); (B) CTZ padrão (10 µg/ml); (C) Após hidrólise ácida; (D) Após hidrólise básica; (E) Após hidrólise neutra; (F) Após degradação oxidativa

3.1.7.2.2 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 10 - 50 µg/mL. A equação obtida a partir da reta foi $y = 15895,67x - 69,87$ e o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998, indicando a linearidade da curva de calibração (figura 20). A validade do ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} = 8568,5 > F_{\text{crítico}} = 0,0001; P = 5 \%$).

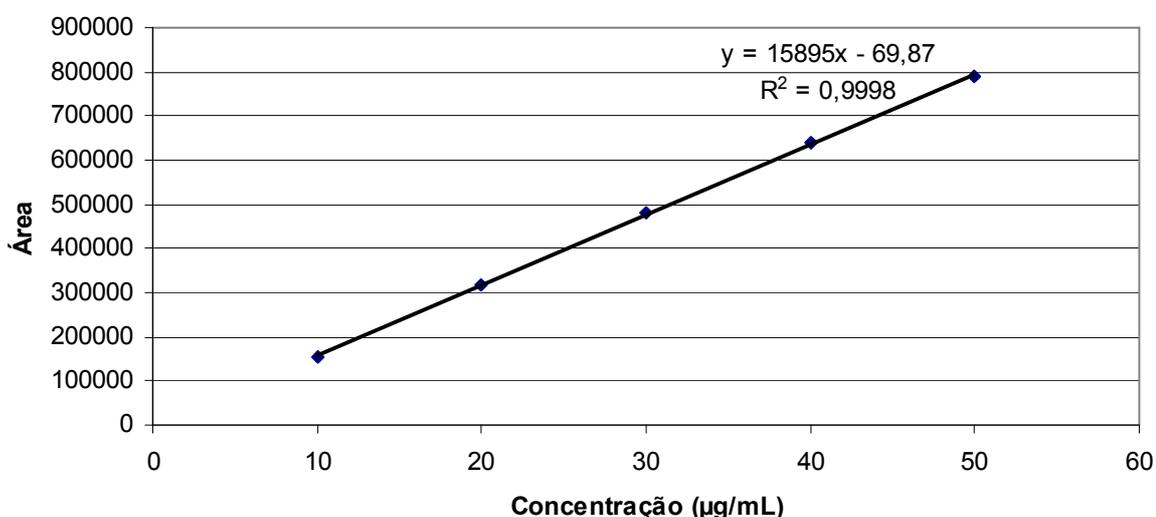


Figura 20. Curva de calibração média da HCTZ obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

O LOQ e LOD calculados foram 1,23 µg/mL e 0,40 µg/mL, os quais foram confirmados experimentalmente, indicando a alta sensibilidade do método.

3.1.7.2.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi calculada a partir da determinação de três replicatas de três diferentes soluções fortificadas. Não foi observada nenhuma diferença entre a quantidade de HCTZ adicionada e a quantidade encontrada ($p < 0,05$). Os valores obtidos estão dentro da faixa de 98,0 – 99,0 % (tabela 13), satisfazendo os critérios do estudo.

Os resultados da precisão intra-dia e inter-dia estão descritos na tabela 13. O teor de HCTZ encontrado nos três diferentes dias foi equivalente ($p < 0,05$), e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %.

Tabela 13. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão

Precisão Inter-dia	% Recuperado	DPR^a (%)
Dia 1 ($n = 6$)	99,6	0,44
Dia 2 ($n = 6$)	99,3	0,51
Dia 3 ($n = 6$)	98,4	0,80
Precisão Intra-dia ($n = 18$)	99,4	0,98

Exatidão ($n = 3$)		
Solução Fortificada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) (DPR %)^a
15	14,93	98,6 (0,3)
30	30,34	101,7 (0,6)
45	45,21	100,6 (0,5)

^a Desvio padrão relativo

3.1.7.2.4 Robustez

Os resultados e a faixa experimental das variáveis estudadas estão descritos na tabela 14. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos teores de HCTZ encontrados nas condições testadas ($p < 0,05$), e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %. As variações na fase móvel resultaram em mudanças no tempo de retenção sem nenhum efeito na quantificação do fármaco na forma farmacêutica. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na quantificação de HCTZ durante o estudo de estabilidade da solução, desta forma, a solução é estável pelo menos por 48 h.

Tabela 14. Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez.

Variável	Faixa investigada	Teor HCTZ ^a (%)	DPR ^b (%)
Fluxo (mL/min)	1,2	101,80	1,3
	1,3	100,12	
	1,4	99,22	
Temperatura da coluna (°C)	35	100,70	0,33
	40	100,12	
	45	100,69	
% acetonitrila	25	99,89	0,52
	30	100,12	
	35	100,90	
pH da fase móvel	2,7	100,80	0,35
	3,0	100,12	
	3,3	100,30	
Estabilidade da solução (48h)	---	99,80	0,22

^a Média de três replicatas

^b Desvio padrão relativo de cada variável

3.1.7.2.5 Análise da suspensão de HCTZ

Os resultados da validação do método analítico provaram que este é capaz de quantificar a HCTZ em uma suspensão farmacêutica, mesmo na presença de produtos de degradação.

A análise quantitativa das formulações F1, F2, F3 e F4 resultou em teores na faixa de 99,8 – 100,7 % (tabela 15).

Tabela 15. Determinação de HCTZ em suspensões farmacêuticas.

Formulação	Quantidade teórica (mg/mL)	Quantidade Experimental ^a (mg/mL)	Teor (%)	DPR ^b (%)
F1	2,50	2,49	99,8	0,12
F2	2,50	2,50	100,1	0,32
F3	2,50	2,52	100,7	0,31
F4	2,50	2,50	100,1	0,17

^a Média de seis replicatas

^b Desvio padrão relativo

3.2 Caracterização microbiológica das suspensões

3.2.1 Contagem de microrganismos viáveis totais e pesquisa de patógenos

Uma suspensão farmacêutica é classificada como um produto não estéril, onde se admite a presença de carga microbiana, embora limitada, tendo em vista as características de sua utilização (PINTO; KANEKO e OHARA, 2003). De acordo com a Farmacopéia Americana (2007), para preparações aquosas para uso oral o limite de bactérias totais permitido é de 100 UFC/mL e para fungos 10 UFC/mL, além de ausência de patógenos. Na tabela 16 estão os resultados das análises de contagem de viáveis totais e pesquisa de patógenos.

Tabela 16. Avaliação da qualidade microbiológica das suspensões

Formulação	Contagem de viáveis totais	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella sp.</i>
F1	< 10 UFC/mL	Ausência
F2	< 10 UFC/mL	Ausência
F3	< 10 UFC/mL	Ausência
F4	< 10 UFC/mL	Ausência

Os resultados dos ensaios de avaliação microbiológica demonstraram que todas as suspensões de HCTZ desenvolvidas atenderam com o especificado nos compêndios oficiais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP, 2007).

3.2.2 Teste do desafio

O teste do desafio é um teste laboratorial que permite verificar o nível de atividade biológica do sistema conservante de um produto farmacêutico. Isto não significa que é uma simulação de uma situação real, e não garante que um sistema conservante que passe no teste nunca permitirá o crescimento de microrganismos no produto (SUTTON e PORTER, 2002). Sua função é avaliar a performance do conservante em condições padrão, descritas em compêndios oficiais (USP, 2007). Desta forma, o teste foi realizado nas suspensões a fim de avaliar a eficácia do conservante benzoato de sódio contra cepas padrão de microrganismos patogênicos.

As densidades ópticas encontradas para as diluições de cada cepa padrão estão descritas na tabela 17.

Tabela 17. Densidade óptica das cepas padrão

Diluição	Densidade óptica			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1:5	0,389	_____	_____	_____
1:10	0,194	0,610	0,331	0,247
1:20	0,102	0,340	0,189	0,127
1:50	0,042	0,148	0,077	0,062
1:100	_____	0,072	0,050	0,033

Após a incubação das placas contendo todas as diluições de cada microrganismo procedeu-se a contagem microbiana a fim de verificar qual diluição correspondeu ao inóculo adequado ao teste (10^5 - 10^6 UFC/mL). Para a *C. albicans* foi selecionada a diluição 1:20, e para os demais microrganismos a diluição 1:100. Depois da padronização não é mais necessário realizar todo o processo de plaqueamento em uma próxima análise, pois se sabe que determinada densidade óptica corresponde ao inóculo desejado. O resultado do teste do desafio está descrito na tabela 18.

Tabela 18. Contagem de sobreviventes do teste do desafio

Tempo (dias)	Formulações teste							
	<i>C. albicans</i> (UFC/mL)		<i>S. aureus</i> (UFC/mL)		<i>E. coli</i> (UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL)	
	F2	F4	F2	F4	F2	F4	F2	F4
0	1×10^6	1×10^6	4×10^6	1×10^6	5×10^6	4×10^6	1×10^6	2×10^6
7	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
14	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
21	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
28	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Tempo (dias)	Formulações controle							
	<i>C. albicans</i> (UFC/mL)		<i>S. aureus</i> (UFC/mL)		<i>E. coli</i> (UFC/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL)	
	F2	F4	F2	F4	F2	F4	F2	F4
0	1×10^6	1×10^6	4×10^6	1×10^6	5×10^6	4×10^6	1×10^6	2×10^6
7	4×10^5	3×10^6	4×10^3	3×10^6	4×10^3	5×10^6	3×10^3	2×10^6
14	3×10^5	1×10^7	7×10^3	6×10^6	9×10^3	7×10^6	6×10^3	3×10^6
21	3×10^5	2×10^7	3×10^4	6×10^6	1×10^5	3×10^7	2×10^4	1×10^7
28	2×10^5	10×10^7	9×10^3	1×10^7	6×10^4	7×10^6	1×10^4	2×10^7

Analisando os resultados das formulações contendo conservante, verifica-se que no tempo zero a contagem de microrganismos foi na ordem de 10^6 UFC/mL. Isto é o desejável em um teste do desafio, pois desta forma confirma-se que a quantidade inicial de inóculo adicionada está correta. No tempo zero o contato entre o microrganismo e o conservante presente na formulação é muito rápido, não permitindo que ocorra uma diminuição da carga microbiana. A partir da análise de 7 dias já se observa uma redução de mais de 90 % de todos os microrganismos testados, não ocorrendo nenhum aumento até os 28 dias de teste. Sendo assim, o conservante benzoato de sódio foi considerado eficiente nas formulações propostas.

As formulações controle foram realizadas nas mesmas condições, porém sem o conservante, para verificar se a própria formulação poderia ter um efeito bactericida ou bacteriostático. Pode-se observar que a carga microbiana permanece elevada até o fim do teste, comprovando a necessidade de um conservante adequado. A suspensão contendo CMC-Na (F2) apresentou uma carga microbiana final em torno de 10^3 a 10^5 UFC/mL para todos os microrganismos, enquanto que a suspensão contendo HPMC (F4) teve uma carga final maior, de 10^6 – 10^7 UFC/mL. Isto pode ser explicado pelo fato de que os polímeros são susceptíveis ao crescimento microbiano, pois a celulose presente é substrato para os microrganismos (KIBBE, 2000). Como a suspensão de CMC-Na contém 0,6 % de polímero, enquanto a suspensão de HPMC contém 0,8 %, a primeira terá menor crescimento por ter menos substrato para os microrganismos.

4. CONCLUSÕES

As características organolépticas das formulações mostraram-se aceitáveis, e o pH foi corrigido para maior estabilidade do fármaco;

Na caracterização físico-química, o uso de polímeros com diferentes características iônicas ocasionou diferenças de comportamento das suspensões com relação ao potencial zeta, redispersibilidade, volume de sedimentação e tamanho de partícula, sendo que a formulação mais adequada com relação a estes parâmetros foi a contendo 0,6 % de CMC-Na (F2);

Na análise de viscosidade, as formulações apresentaram fluxo não-newtoniano pseudoplástico, e o valor de viscosidade aparente e do grau de pseudoplasticidade foi dependente da concentração de polímero utilizada;

O método para doseamento de HCTZ nas suspensões foi previamente validado e o teor encontrado foi considerado satisfatório;

O controle microbiológico das suspensões está de acordo com o especificado em compêndios oficiais;

O teste do desafio demonstrou que o conservante utilizado nas formulações é eficiente contra microrganismos patogênicos.

5. REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005. 677 p.

BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, 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.335-341, 2008.

BENCHABANE, A.; BEKKOUR, K. Effects of anionic additives on the rheological behavior of aqueous calcium montmorillonite suspensions. **Rheologica Acta**, v.45, p. 425–434, 2006.

BEZERRIL, L. M.; VASCONCELOS, C. L.; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. Rheology of chitosan-kaolin dispersions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 287, p. 24–28, 2006.

BOURNONVILLE, B.; NZIHOU, A. Rheology of non-Newtonian suspensions of fly ash: effect of concentration, yield stress and hydrodynamic interactions. **Powder Technology**, v. 128, p. 148–158, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVS - **Portaria 518, de 25 de março de 2004**. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 02 de abril de 2006.

BRITISH PHARMACOPOEIA, v. II. London: The Stationery Office, 2000.

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 284–285, p. 458–463, 2006.

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

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

CHANG, H. C.; LI, L. C.; TOONGSUWAN, S.; STEPHENS, D.; LIU, R. M.; PLICHTA-MAHMOUD, H. Development of a topical suspension containing three active ingredients. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 29-39, 2002.

CLASEN, C.; KULICKE, W. M. Determination of viscoelastic and rheo-optical material function of water-soluble cellulose derivatives. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1839-1919, 2001.

CLESCERL, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. 21. ed. Washington: APHA, 2005. 1368 p.

CUDINA, O.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; RUVARAC-BUGARCIC, I.; JANKOVIC, I. Interaction of hydrochlorothiazide with cationic surfactant micelles of cetyltrimethylammonium bromide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 256, p. 225–23, 2005.

DAPÍA, S.; TOVAR, C. A.; SANTOS V.; PARAJÓ, J. C. Rheological behaviour of carboxymethylcellulose manufactured from TCF-bleached Milox pulps **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 313-320, 2005.

DEICKE, A.; SUVERKRUP, R. Dose uniformity and redispersibility of pharmaceutical suspensions I: quantification and mechanical modelling of human shaking behaviour. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, p. 225-232, 1999.

DEICKE, A.; SUVERKRUP, R. Dose uniformity and redispersibility of pharmaceutical suspensions 2: assessment of three commercial erythromycin ethyl succinate oral liquids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 73-78, 2000.

DIAZ, D. G., & NAVAZA, J. M. Rheology of aqueous solutions of food additives effect of concentration, temperature and blending. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 387–392, 2003.

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

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

FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista da Escola de Minas**, v. 58, n. 1, p. 83-87, 2005.

FILHO, G. N. S.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia. Manual de aulas práticas**. 2. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 157 p.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: USP, 2003. 732 p.

GABRIELS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Experimental designed optimization and stability evaluation of dry suspensions with artemisinin derivatives for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 283, p. 19-34, 2004.

GONCHARUK, E. V.; PAKHOVCHISHIN, S. V.; ZARKO, V. I.; GUN'KO, V. M. Properties of Aqueous Suspensions of Highly Dispersed Silica in the Presence of Polyvinylpyrrolidone. **Colloid Journal**, v. 63, n. 3, p. 283–289, 2001.

GHANNAM, M. T.; ESMAIL, N. Rheological properties of carboxymethyl cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, n. 2, p. 289-301, 1997.

HERTZOG D. L.; MCCAFFERTY J. F.; FANG X.; TYRRELL R. J.; REED R. A. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 747-760, 2002.

HUGO, W. B.; RUSSEL, A. D. **Pharmaceutical Microbiology**. 6 ed. London: Blackwell Science, 1998.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology**, 2005.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000. 665 p.

KITTIPONGPATANA, O. S.; SIRITHUNYALUG, J.; LAENGER, R. Preparation and physicochemical properties of sodium carboxymethyl mungbean starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 105-112, 2006.

LI, Y.; HOU, W.; ZHU, W. Thixotropic properties of aqueous suspensions containing cationic starch and aluminum magnesium hydrotalcite-like compound. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 305–314, 2007.

LUSINA, M.; CINDRIC, T.; TOMAIC, J.; PEKO, M.; POZAIC, L.; MUSULIN, N. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 127-137, 2005.

MACEDO, J. A. B. **Métodos Laboratoriais de análise Físico-Químicas e microbiológicas**. 2 ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2003.

MALTESE, A.; BORZACCHIELLO, B.; MAYOLC, L.; BUCOLO, C.; MAUGERIA, F.; NICOLAIS, L.; AMBROSIO, L. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization. **Biomaterials**, v. 27, p. 5134–5142, 2006.

MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em:
<http://www.malvern.co.uk/LabEng/products/IWTM/iwtm.htm>> Acesso: 21 de maio de 2007.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. Part 18: Coarse dispersion. In: **Physical Pharmacy**, 4. ed. Lea & Febiger: Philadelphia, 2003,.

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.

MORRISON, F.A., **Understanding rheology**, New York: Oxford University Press, 2001.

NIAZI, S. **Regulatory and Manufacturing Guidance. Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations: liquid products**, v. 3. Chicago: CRC Press, 2004.

ORTEGA, F. S.; PANDOLFELLI, V. C.; RODRIGUES, J. A.; SOUZA, D. P. F. Aspectos da Reologia e Estabilidade de Suspensões Cerâmicas. Parte III: Mecanismo de Estabilização Eletroestérica de Suspensões com Alumina. **Cerâmica**, v. 43, p. 281-282, 1997.

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

PHENRAT, T.; SALEH, N.; SIRK, K.; KIM, H.; TILTON, R. B.; LOWRY, G. V. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. **Journal of Nanoparticle Reserach**, DOI 10.1007/s11051-007-9315-6, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

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

RUSSELL, A. D. Challenge testing: Principles and practice. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 25, p. 143-153, 2003.

SAVITSKAYA, T. A.; NEVAR, T. N.; GRINSHPAN, D. D. The Effect of Water-Soluble Polymers on the Stability and Rheological Properties of Suspensions of Fibrous Activated Charcoal. **Colloid Journal**, v. 68, n. 1, p. 86–92, 2006.

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

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopoeia and the ICH. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHEKUNOV, B.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H.; CHOW, A. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, 2006.

SHOJAEIA, A.; AREFINIA, R. Analysis of the sedimentation process in reactive polymeric suspensions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 7565 – 7578, 2006.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology Online**. Disponível em: www.pharmaportal.com. Acesso em 03 de janeiro de 2008.

SUTTON, V. W.; PORTER, D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter <51>. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 56, n.6, p. 301-311, 2002.

TERAYAMA, H.; INADA, K.; NAKAYAMA, H.; YASUEDA, S.; ESUMI, K. Preparation of stable aqueous suspension of a hydrophobic drug with polymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, p. 159-164, 2004.

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

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

VASCONCELOS, C. L.; DANTAS, T. N.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Reology of concentrated alumina-polyelectrolyte systems. **Colloid Polymer Science**, v. 282, p. 596-601, 2004.

ZHANG, L.; KONG, T. Aqueous polysaccharide blends based on hydroxypropyl guar gum and carboxymethyl cellulose: synergistic viscosity and thixotropic properties. **Colloid Polymers Science**, v. 285, p. 145–151, 2006.

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

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

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

YOKOI, Y. Effects of sugar ester and hydroxypropyl methylcellulose on the physicochemical stability of amorphous cefditoren pivoxil in aqueous suspension. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 91-99, 2005.

YOSHIDA, H.; NURTONO, T.; FUKUI, K. A new method for the control of dilute suspension sedimentation by horizontal movement. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 7565 – 7578, 2006.

WANG, X.; GUO, L. Effect of preparation methods on rheological properties of $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ suspensions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 281, n. 1-3, p. 171-176, 2006.

WESTRA, J. G. Rheology of (carboxymethyl) cellulose with xanthan gum properties. **Macromolecules**, v. 22, p. 367–370, 1989.

WONG, J.; PAPADOPOULOS, P.; WERLING, J.; REBBECK, C.; DOTY, M.; KIPP, J.; KONKEL, J.; NEUBERGER, D. Itraconazole suspension for intravenous injection: Determination of the real component of complete refractive index for particle sizing by static light scattering. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 60, n. 5, p. 303-313, 2006.

CAPÍTULO IV

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SUSPENSÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA (HCTZ)

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos está sujeito a alguma forma de decomposição química, particularmente em formulações líquidas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

O termo estabilidade se refere à integridade química e física da forma farmacêutica (USP, 2007). O estudo de estabilidade é necessário para que se possa garantir a pureza, a inocuidade, a potência e a eficácia do produto, e estabelecer por quanto tempo, desde o momento de sua produção, estas características podem ser mantidas (CARSTENSEN e RHODES, 2000; USP, 2007).

As reações químicas que prejudicam a estabilidade são reações de hidrólise, oxidação, redução, esterificação, descarboxilação e polimerização, podendo ocorrer em sistemas homogêneos ou heterogêneos. Estas reações químicas podem ser iniciadas ou aceleradas pelos fatores ambientais de temperatura, umidade e luz (GENNARO, 2000). Outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, entre outros também devem ser cuidadosamente analisados (BRASIL, 2005).

A instabilidade das formulações farmacêuticas pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e no sabor, enquanto em outros casos podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes, e que só podem ser determinadas por metodologias específicas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde pequenas quantidades de substâncias podem ser detectadas, resultando em uma indicação sensivelmente confiável para estimar a estabilidade de produtos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; GENNARO, 2000).

Os estudos de estabilidade são classificados como estudos acelerados, estudos de acompanhamento ou estudos de longa duração (BRASIL, 2005, ICH, 2003). O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. De acordo com a Resolução N° 1 da ANVISA (2005), formas farmacêuticas líquidas em embalagem impermeável devem ser submetidas a um estudo de estabilidade acelerado na temperatura de 40 ± 2 °C, por 6 meses, sendo desnecessário o estudo com umidade controlada.

Os estudos de longa duração são projetados para verificação das características de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade

esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. Para formas farmacêuticas líquidas em frasco impermeável é realizado a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período mínimo de 12 meses (BRASIL, 2005). Para verificar se o produto farmacêutico mantém as características encontradas no estudo de longa duração é realizado um estudo de acompanhamento a cada 12 meses.

Contudo, deve-se considerar ainda a necessidade de estudos que excedam as condições utilizadas nos ensaios de estabilidade acelerada, que recebem o nome de estudos de *stress*. Estes estudos são utilizados para demonstração da especificidade na validação de métodos analíticos e identificação antecipada de possíveis produtos de degradação (KLICK et al., 2005).

Em suspensões farmacêuticas é especificada a realização de doseamento do princípio ativo e determinação do pH, nas condições estabelecidas pelos compêndios oficiais. Assim, para fins de prazo de validade provisório de 24 meses é aprovado o estudo de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5 % do teor inicial. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1 e 10 % no estudo de estabilidade acelerado o prazo de validade provisório é de 12 meses (BRASIL, 2005).

Além das resoluções disponíveis para realização do estudo de estabilidade, as reações de degradação e os princípios de cinética química devem ser investigados, visto que as reações de degradação nos medicamentos ocorrem em velocidades definidas e são de natureza química (AULTON, 2005). Desta forma, é fundamental na cinética química a definição de velocidade e ordem de reação. A velocidade da reação é a variação de uma espécie em relação ao tempo, enquanto que a ordem da reação permite definir esta variação da velocidade com a concentração dos reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Reações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem estão entre as mais importantes nos estudos de degradação de fármacos (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Nas reações de ordem zero a decomposição ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração de quaisquer dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. As reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional a concentração de dois reagentes (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; NETZ e ORTEGA,

2002). A substituição do valor de k na ordem apropriada da reação permite que a quantidade de degradação, após um determinado intervalo de tempo, seja calculada. Os resultados de um estudo cinético são expressos em termos do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), isto é, o tempo necessário para que a concentração de fármaco seja metade do valor inicial. O tempo $t_{90\%}$ tem um sentido maior nos estudos de estabilidade e indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 % da concentração inicial de fármaco. O $t_{90\%}$ é preconizado como o limite de degradação máxima que um fármaco pode sofrer, visando à sua utilização pelo paciente (CARSTENSEN e RHODES, 2000; NETZ e ORTEGA, 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo é apresentar o estudo de estabilidade físico-química da HCTZ nas suspensões desenvolvidas através de um estudo de estabilidade acelerado e determinar o prazo de validade.

2. METODOLOGIA

As suspensões foram armazenadas nas temperaturas de 4, 25 e 40 °C. As tomadas de amostras foram feitas nos tempos de 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, procedendo aos ensaios descritos a seguir.

2.1 Estabilidade física

2.1.1 Características organolépticas

As propriedades físicas (aparência, odor e sabor) originais das suspensões foram monitoradas durante o tempo de estocagem para os estudos de estabilidade.

2.1.2 Avaliação do comportamento reológico

A viscosidade das suspensões submetidas ao estudo de estabilidade foi avaliada conforme metodologia previamente descrita no capítulo III.

2.2 Estabilidade química

2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada mediante metodologia previamente descrita no capítulo III.

2.2.2 Avaliação da termoestabilidade

As suspensões foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia previamente validada (capítulo III). A análise das amostras objetivou a determinação do teor de HCTZ e o cálculo do prazo de validade para cada formulação.

De acordo com os dados obtidos, a cinética de degradação foi determinada através da análise da ordem de reação, da constante de velocidade de reação (k), do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e do tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 % ($t_{90\%}$).

Para determinar a ordem de reação, a quantidade de fármaco degradado nos intervalos de tempo especificados foi determinada e os dados foram distribuídos graficamente, plotando a concentração do fármaco em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração do fármaco em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração do fármaco em função do tempo (segunda ordem). A partir do cálculo dos coeficientes de correlação (r), determinou-se a ordem de reação considerando a melhor reta obtida.

Para o cálculo da constante de velocidade (k), do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e do tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 % ($t_{90\%}$) foram utilizadas as equações descritas na tabela 19, de acordo com a ordem de reação encontrada.

Tabela 19. Equações cinéticas para cálculo da degradação do fármaco.

Ordem de reação	k (dias⁻¹)	t_{1/2} (dias)	t_{90%} (dias)
Zero ordem	$C_0^a - C^b / t$	$C_0 / 2k$	$0,1 \cdot C_0 / k$
Primeira ordem	$2,303 / t \times \log C_0 / C$	$0,693 / k$	$0,106 / k$
Segunda ordem	$1 / t \times (1 / C - 1 / C_0)$	$1 / kC_0$	$1 / 9K \times C_0$

^a Concentração do fármaco no tempo zero

^b Concentração do fármaco após degradação por um tempo t

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabilidade física

3.1.1 Características organolépticas

Com relação ao sabor e odor todas as formulações mantiveram-se dentro das especificações (ensaios realizados no capítulo III), durante o tempo de estocagem para os estudos de estabilidade.

Nas formulações contendo CMC-Na (F1 e F2) armazenadas em geladeira (4 °C), foi observado, após um período de estocagem de 90 dias, o aparecimento de grumos congelados, provavelmente provocados por uma instabilidade do polímero à baixas temperaturas. Desta forma, estas formulações foram descartadas do estudo de estabilidade química, pois este fato alterou a correta homogeneização da suspensão, podendo levar a uma quantificação errônea do fármaco. As demais formulações armazenadas em temperatura ambiente e estufa não apresentaram mudanças no aspecto. Nas formulações contendo HPMC (F3 e F4) não ocorreu mudança no aspecto inicial em nenhuma das condições de armazenamento até o fim do estudo.

3.1.2 Avaliação do comportamento reológico

As características reológicas de uma suspensão podem ter uma grande importância sendo o fator determinante na otimização da estabilidade física (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Conforme descrito no capítulo III, mudanças na temperatura alteram as forças de interação poliméricas, modificando a viscosidade da suspensão (BENCHABANE e BEKKOUR, 2006; DAPIA et al., 2005; DIAZ e NAVAZA, 2003; VALENZA et al., 2005).

Em estudo utilizando CMC-Na em concentrações de 0,5 a 2 %, Cancela e colaboradores (2005) verificaram que o aumento na temperatura de 25 a 40 °C levou à diminuição na viscosidade das suspensões. Dados da literatura afirmam que o polímero HPMC também é sensível a altas temperaturas (KIBBE, 2000). A explicação para estes fatos é que a energia térmica das moléculas é maior em altas temperaturas, aumentando a distância intermolecular devido à expansão térmica (CANCELA; ALVAREZ; MACEIRAS, 2005; YASAR e TOGRUL, 2007).

Na figura 21 pode ser visualizado o gráfico de viscosidade aparente das formulações contendo CMC-Na nas concentrações de 0,4 e 0,6 % (F1 e F2) em três temperaturas.

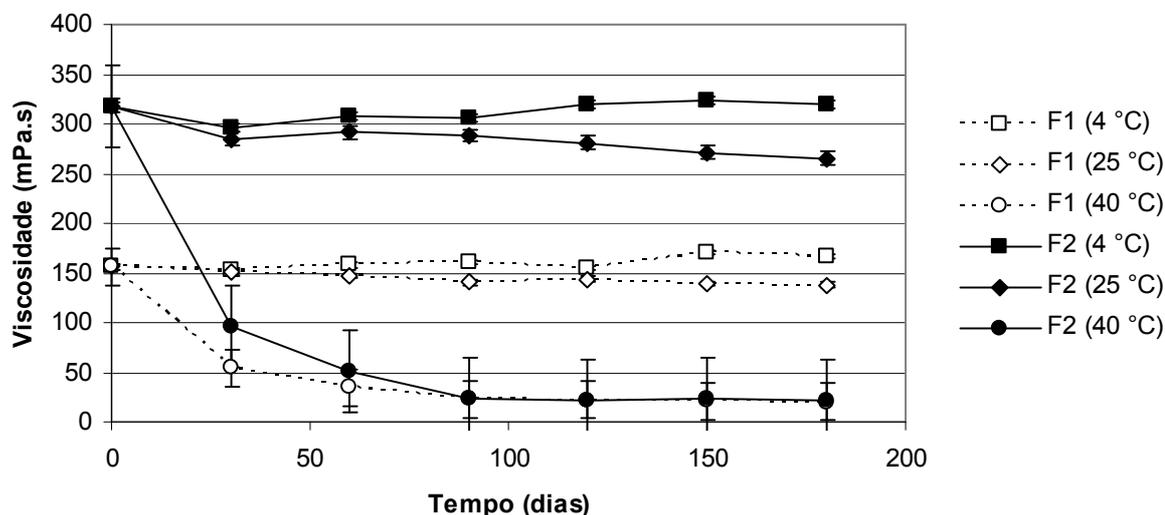


Figura 21. Viscosidade aparente (300 s^{-1} , $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) das formulações F1 e F2 durante o estudo de estabilidade acelerado.

De acordo com a figura 21, pode-se observar que as suspensões contendo CMC-Na apresentaram o mesmo comportamento de fluxo nas duas concentrações analisadas, durante o armazenamento em diferentes condições de temperatura.

As formulações armazenadas em temperatura ambiente a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram um decréscimo da viscosidade durante o estudo, sendo que a formulação F1 teve uma queda de 11,7 % da viscosidade inicial, enquanto que na formulação F2 a queda foi de 16,7 % após 180 dias de estudo.

Na temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ as suspensões apresentaram um leve aumento na viscosidade a partir de 60 dias, que continuou aumentando até o fim do estudo. Analisando este aumento de viscosidade em porcentagem, ambas as formulações mantidas em geladeira tiveram um aumento de 20 % na viscosidade em 180 dias quando comparadas com os valores de temperatura ambiente no mesmo período.

Por outro lado, as formulações armazenadas em estufa a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma diferença significativa após 180 dias, com queda de viscosidade de 85,5 % para F1 e 92,5 % para F2, comparadas com as suspensões mantidas em temperatura ambiente.

Na figura 22 pode ser visualizado o gráfico de viscosidade aparente das formulações contendo HPMC nas concentrações de 0,6 e 0,8 % (F3 e F4) em três temperaturas.

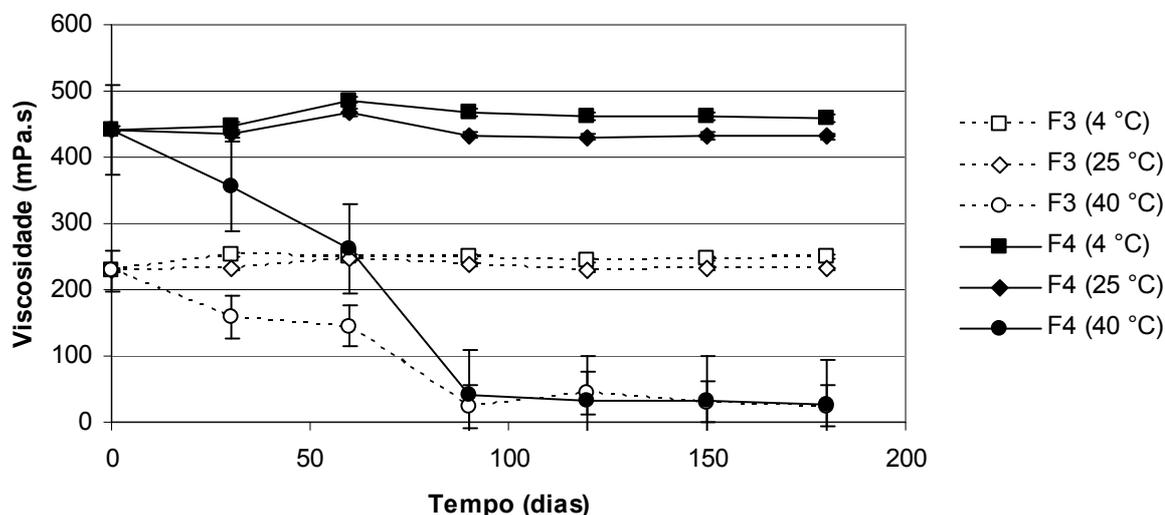


Figura 22. Viscosidade aparente (300 s^{-1} , $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) das formulações F3 e F4 durante o estudo de estabilidade acelerado.

O comportamento das formulações contendo HPMC apresentou algumas diferenças em relação ao CMC-Na, pois as formulações armazenadas em temperatura ambiente a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tiveram um leve aumento da viscosidade em 60 dias de estudo, de 7,7 % para F3 e 5,7 % para F4, comparados com a viscosidade inicial. Entretanto, após os 60 dias a viscosidade de ambas as formulações diminuiu para valores próximos ao inicial, permanecendo estáveis até os 180 dias.

As formulações F3 e F4 armazenadas em geladeira a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tiveram um comportamento similar a F1 e F2, aumentando a viscosidade após 30 dias e mantendo até o fim do estudo. A viscosidade após 180 dias teve um aumento de 7,6 % para F3 e 6,5 % para F4 mantidas em geladeira, comparadas com as suspensões mantidas em temperatura ambiente.

Da mesma forma as formulações armazenadas em estufa a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tiveram uma queda na viscosidade já nos primeiros 30 até 90 dias, onde foi alcançada viscosidade constante. A queda de viscosidade em porcentagem encontrada no fim de 180 dias foi de 89,6 % para F3 e 93,9 % para F4, comparadas com suspensões a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta diminuição acentuada da viscosidade em temperatura elevada para todas as formulações ocorre pois, altas temperaturas despolimerizam o polímero através de clivagem aleatória da cadeia

diminuindo permanentemente a viscosidade da formulação (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; KIBBE, 2000).

A partir dos resultados obtidos confirma-se a estabilidade física das suspensões analisadas durante 180 dias em temperatura ambiente (25 °C).

3.2 Estabilidade química

3.2.1 Determinação do pH

Levando em conta a importância do pH como teste de estabilidade a ser aplicado em formas farmacêuticas líquidas, as amostras foram analisadas quanto a este parâmetro em todos os tempos de análise.

Conforme os resultados obtidos (figura 22), foi verificado que ocorreu uma diminuição do pH com o decorrer do tempo em todas as temperaturas do estudo de estabilidade, sendo mais pronunciada nas formulações contendo HPMC armazenadas em estufa a 40 °C. Porém, todos os valores de pH permaneceram na faixa de 3 – 3,3 durante o estudo, estando dentro da faixa de estabilidade da HCTZ.

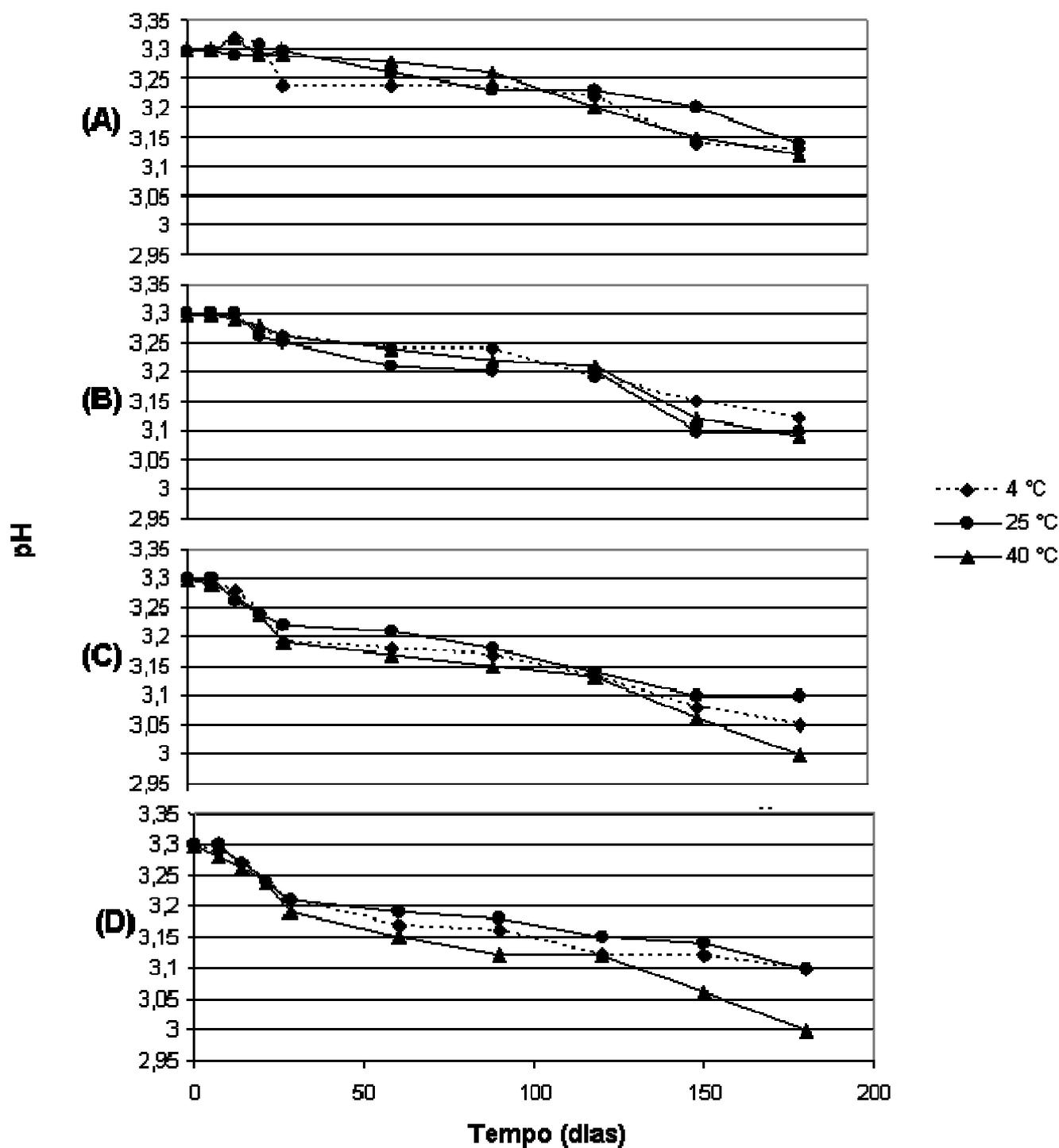


Figura 23. Valores de pH obtidos durante o estudo de estabilidade acelerado (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4.

3.2.2 Avaliação da termoestabilidade

Neste estudo a temperatura de 4 °C foi comparada a temperatura ambiente (25 °C), pois muitos pacientes costumam armazenar produtos líquidos na geladeira, mesmo sem necessidade. Entretanto, como verificado no estudo de estabilidade física, esta temperatura não é indicada para suspensões contendo CMC-Na. Desta forma as análises das suspensões de CMC-Na (F1 e F2) armazenadas a 4 °C foram descartadas a partir de 90 dias de estudo.

O ensaio de *stress*, realizado em condições mais drásticas do que o estudo acelerado, foi utilizado para demonstração da especificidade na validação do método (capítulo III), onde foi identificado o principal produto de degradação da HCTZ, que é a clorotiazida (CTZ).

Na figura 24 podem ser visualizados os cromatogramas obtidos das formulações F1, F2, F3 e F4 após 180 dias de estudo, nas temperaturas de 25 e 40 °C. Os cromatogramas das formulações F3 e F4 armazenadas na temperatura de 4 °C não estão demonstrados na figura, pois estes se apresentaram similares aos das formulações armazenadas a 25 °C, sem aparecimento de picos de degradação. Nos cromatogramas das formulações armazenadas a 40 °C pode-se visualizar o aparecimento do pico da clorotiazida com um tempo de retenção de 3,2 min, devido à maior degradação do fármaco nesta temperatura.

Os dados quantitativos obtidos através de CLAE no estudo de estabilidade acelerado estão descritos na tabela 20 e podem ser visualizados na figura 25. Os resultados foram expressos como teor residual (%) ou percentagem residual de HCTZ, considerando o teor da amostra no tempo zero como referência para os cálculos.

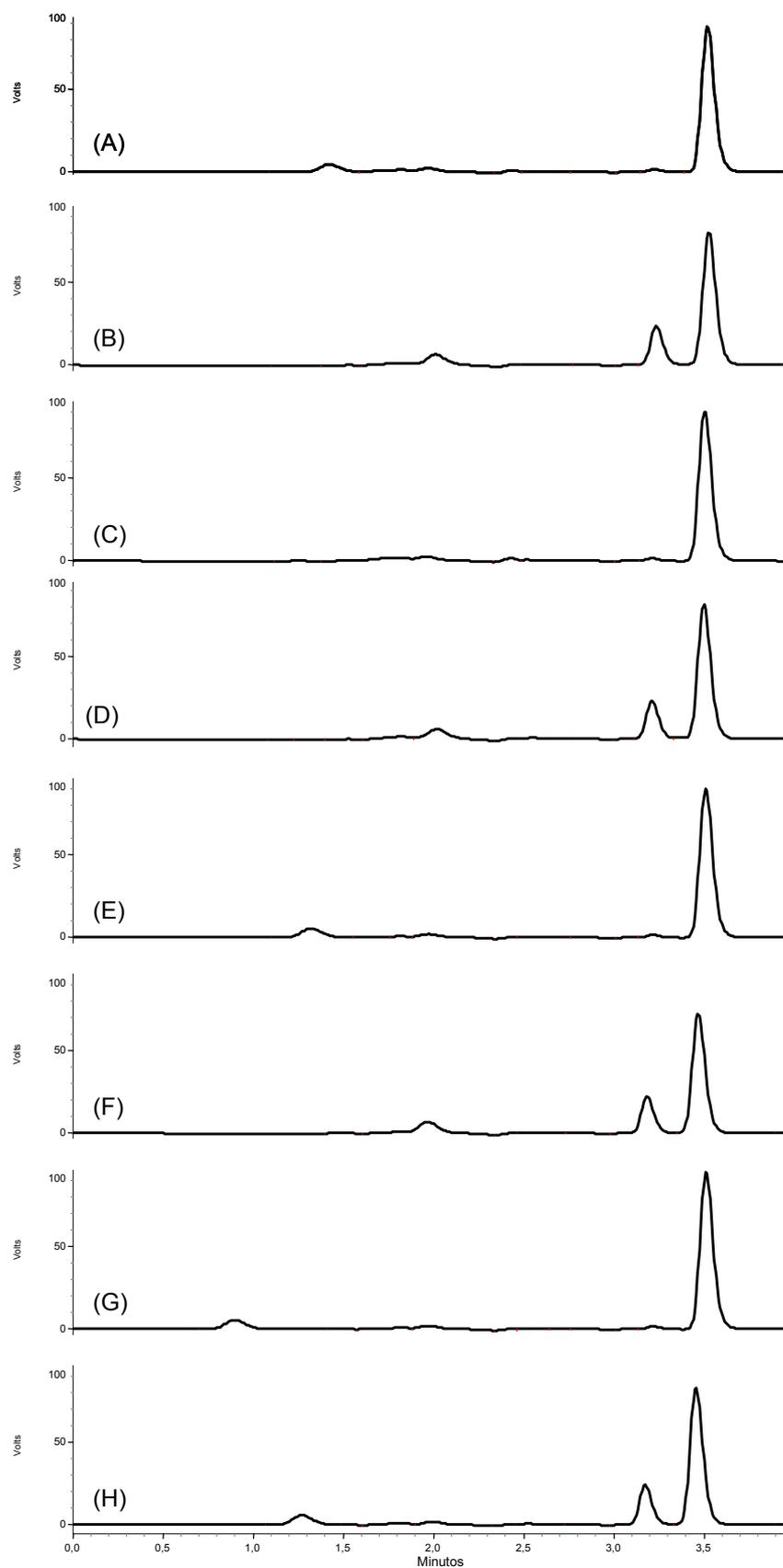


Figura 24. Cromatogramas das formulações F1, F2, F3 e F4 obtidos ao final de 180 dias de estudo de estabilidade: (A) F1 a 25 °C; (B) F1 a 40 °C; (C) F2 a 25 °C; (D) F2 a 40 °C; (E) F3 a 25 °C; (F) F3 a 40 °C; (G) F4 a 25 °C; (H) F4 a 40 °C.

Tabela 20. Valores de teor residual de HCTZ (%) em suspensões obtidos no estudo de estabilidade acelerado.

Formulações	Tempo (dias)	Teor residual de HCTZ ^a (%) ± DPR ^b (%)		
		4 °C	25 °C	40 °C
F1	0	99,8 ± 0,12	99,8 ± 0,12	99,8 ± 0,12
	7	98,1 ± 0,13	97,9 ± 0,18	96,9 ± 0,04
	14	97,4 ± 0,24	97,0 ± 0,12	94,7 ± 0,32
	21	97,2 ± 0,19	96,8 ± 0,71	89,0 ± 0,44
	28	95,5 ± 0,23	95,9 ± 0,26	87,3 ± 0,34
	60	93,4 ± 0,40	95,5 ± 0,22	86,1 ± 0,21
	90	-----	94,4 ± 0,43	85,7 ± 0,66
	120	-----	93,2 ± 0,21	85,6 ± 0,14
	150	-----	92,2 ± 0,32	84,2 ± 0,12
	180	-----	90,3 ± 0,35	80,0 ± 0,56
F2	0	100,1 ± 0,32	100,1 ± 0,32	100,1 ± 0,32
	7	99,9 ± 0,23	98,3 ± 0,39	97,8 ± 0,54
	14	97,8 ± 0,21	98,1 ± 0,16	97,5 ± 0,33
	21	97,7 ± 0,14	97,8 ± 0,18	90,9 ± 0,35
	28	97,3 ± 0,16	97,6 ± 0,42	89,7 ± 0,36
	60	94,7 ± 0,43	96,9 ± 0,25	87,3 ± 0,44
	90	-----	96,4 ± 0,25	85,6 ± 0,45
	120	-----	94,4 ± 0,37	84,9 ± 0,24
	150	-----	92,7 ± 0,55	81,7 ± 0,33
	180	-----	90,5 ± 0,16	76,0 ± 0,11
F3	0	100,7 ± 0,31	100,7 ± 0,31	100,7 ± 0,31
	7	100,2 ± 0,22	98,6 ± 0,32	99,4 ± 0,32
	14	99,4 ± 0,41	97,5 ± 0,13	92,1 ± 0,43
	21	98,4 ± 0,64	96,3 ± 0,21	89,5 ± 0,24
	28	97,5 ± 0,11	96,0 ± 0,54	88,5 ± 0,20
	60	95,4 ± 0,31	95,4 ± 0,76	85,6 ± 0,56
	90	94,8 ± 0,14	92,2 ± 0,44	81,1 ± 0,28
	120	93,7 ± 0,17	94,9 ± 0,23	80,5 ± 0,39
	150	92,8 ± 0,56	90,9 ± 0,29	79,1 ± 0,30
	180	91,1 ± 0,53	90,9 ± 0,20	63,3 ± 0,21
F4	0	100,1 ± 0,17	100,1 ± 0,17	100,1 ± 0,17
	7	101,2 ± 0,42	101,0 ± 0,16	98,7 ± 0,28
	14	99,0 ± 0,23	100,0 ± 0,13	97,7 ± 0,17
	21	98,2 ± 0,13	97,1 ± 0,24	89,3 ± 0,26
	28	97,7 ± 0,20	95,5 ± 0,36	89,0 ± 0,43
	60	97,5 ± 0,25	95,5 ± 0,27	86,8 ± 0,26
	90	96,4 ± 0,43	94,9 ± 0,32	85,9 ± 0,51
	120	92,1 ± 0,23	90,2 ± 0,34	84,2 ± 0,21
	150	90,7 ± 0,16	89,3 ± 0,29	81,1 ± 0,25
	180	88,1 ± 0,15	87,1 ± 0,29	77,0 ± 0,26

^a média de três determinações^b desvio padrão relativo

De acordo com a tabela, verifica-se que a degradação de HCTZ em maior velocidade ocorreu na temperatura de 40 °C, a qual foi responsável por uma redução no

teor de aproximadamente 10 % já nos primeiros 21 dias de teste para todas as formulações. Nas temperaturas de 4 (exceto F1 e F2) e 25 °C, as formulações apresentaram-se estáveis por um período de tempo maior, ocorrendo degradação de cerca de 10 % de HCTZ ao fim de 180 dias de estudo para todas as formulações.

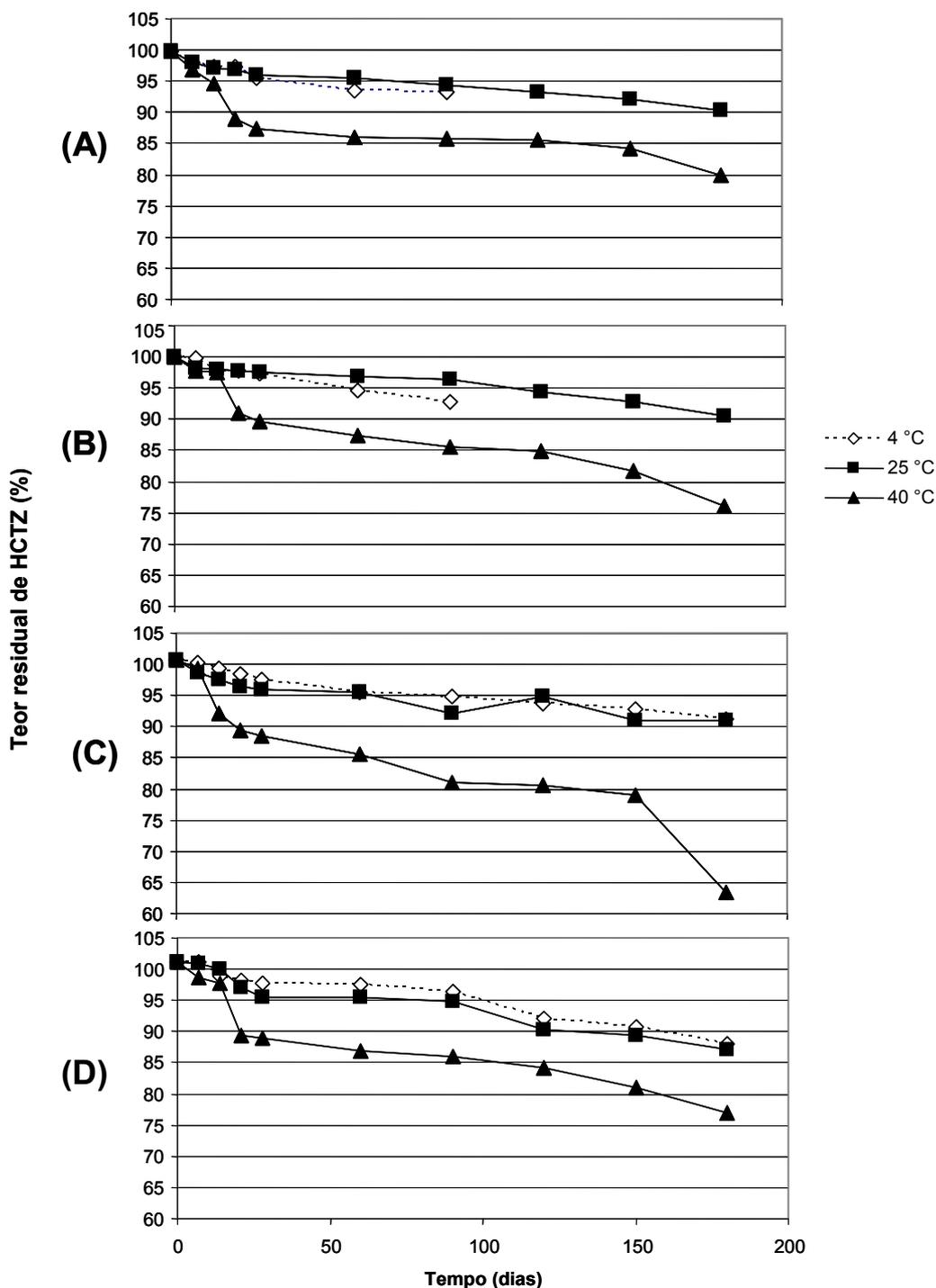


Figura 25. Teor residual de HCTZ após 180 dias de estudo de estabilidade nas temperaturas de 4, 25 e 40 °C.

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determina o conhecimento do perfil de degradação ou perfil de concentração-tempo de um fármaco ou medicamento (CARSTENSEN e RHODES, 2000). A partir dos resultados de teor residual de HCTZ foram plotados gráficos a fim de definir a ordem das reações. A construção dos gráficos resultou em curvas, onde pode ser definido o valor do coeficiente de correlação linear (r) e a inclinação da reta. Os maiores valores de r foram observados com a plotagem dos dados de 1/concentração residual pelo tempo de estocagem. Desta forma a HCTZ sofre uma degradação seguindo a segunda ordem de reação para todas as temperaturas avaliadas, ou seja, a velocidade é dependente da concentração dos reagentes. Assim, a constante de velocidade (k) e o tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 % ($t_{90\%}$) foram calculados a partir das equações para segunda ordem (tabela 21).

Tabela 21. Valores de k e $t_{90\%}$ obtidos utilizando-se as equações de segunda ordem para as temperaturas em estudo.

Temperatura	Formulação	k (dias ⁻¹)	$t_{90\%}$ (dias)
4 °C	F3	$5,8 \times 10^{-6}$	190
	F4	$8,1 \times 10^{-6}$	135
25 °C	F1	$5,8 \times 10^{-6}$	190
	F2	$5,9 \times 10^{-6}$	188
	F3	$5,9 \times 10^{-6}$	185
	F4	$8,8 \times 10^{-6}$	124
40 °C	F1	$1,3 \times 10^{-5}$	87
	F2	$1,7 \times 10^{-5}$	63
	F3	$3,2 \times 10^{-5}$	34
	F4	$1,7 \times 10^{-5}$	64

Pode-se observar que os dados de $t_{90\%}$ das formulações armazenadas a 4 e 25 °C conferem com os valores de teor residual de HCTZ após 180 dias de estudo (tabela 20). Por outro lado, os valores de teor residual para as formulações armazenadas em estufa a 40 °C não estão condizentes com a tabela, provavelmente devido à degradação do fármaco não ter sido superior a 50 % no período de estudo determinado, o que pode ter levado a uma ordem de reação errônea.

No caso da legislação brasileira (Resolução N° 1, ANVISA), as formulações armazenadas a 40 °C por 6 meses apresentaram variações no teor acima de 10 %, que seria o valor máximo para a concessão do prazo de validade provisório de 12 meses. Porém, como se trata de uma formulação que não será comercializada, a resolução não foi

utilizada como parâmetro para estabelecer o prazo de validade, sendo este estabelecido a partir dos cálculos de cinética química.

Desta forma, foi possível estimar um prazo de validade de 190, 188, 185 e 124 dias para as formulações F1, F2, F3 e F4, respectivamente, armazenadas em temperatura ambiente a 25 °C.

4. CONCLUSÕES

Todas as formulações testadas apresentaram-se estáveis com relação a sabor e odor no período de estudo;

As formulações F1 e F2 (contendo CMC-Na) apresentaram instabilidade física com relação à aparência quando armazenadas em geladeira a 4 °C;

Todas as formulações sofreram uma queda da viscosidade aparente inicial, sendo mais acentuada quando armazenadas em estufa a 40 °C;

O pH das formulações apresentou uma leve queda durante o estudo, porém, permaneceu dentro da faixa de estabilidade do fármaco;

As formulações apresentaram degradação química em valores crescentes com a temperatura;

O prazo de validade para as formulações F1, F2, F3 e F4 armazenadas em temperatura ambiente a 25 °C foi de 190, 188, 185 e 124 dias, respectivamente, seguindo uma reação de segunda ordem.

5. REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 677 p.

BENCHABANE, A.; BEKKOUR, K. Effects of anionic additives on the rheological behavior of aqueous calcium montmorillonite suspensions. **Rheologica Acta**, v.45, p. 425–434, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVS- **Resolução N° 1, de 29 de julho de 2005**. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 05 de março de 2006.

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

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

DAPIA, S.; TOVAR, C. A.; SANTOS, V.; PARAJO, J. C. Rheological behaviour of carboxymethylcellulose manufactured from TCF bleached milox pulps. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 313–320, 2005.

DIAZ, D. G.; NAVAZA, J. M. Rheology of aqueous solutions of food additives effect of concentration, temperature and blending. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 387–392, 2003.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: USP, 2003, 732p.

GENNARO, A. R. **Remington. The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 2077 p.

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

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000. 665 p.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; DE GRIEND, C. S.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, Iselin, p. 48-66, 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LUCAS, E. F., SOARES, G. S., MONTEIRO, E. C. **Caracterização de polímeros**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-Química**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 299 p.

VALENZA, D. C.; MERLE, L.; MOCANU, G.; PICTON, L.; MULLER, G. Rheological properties of hydrophobically modified carboxymethylcelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 87–94, 2005.

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

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

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DIURÉTICA DE SUSPENSÕES DE HIDROCLOROTIAZIDA (HCTZ) EM RATOS

1. INTRODUÇÃO

A urina é uma solução aquosa complexa formada nos rins, constituída de sais inorgânicos e produtos orgânicos da eliminação, provenientes do metabolismo. A uréia, resíduo metabólico produzido no fígado a partir da utilização de proteínas e aminoácidos, representa quase metade dos corpos sólidos dissolvidos na urina. Outras substâncias orgânicas são, principalmente a creatinina e o ácido úrico. O principal componente inorgânico dissolvido na urina é o cloreto, seguido pelo sódio e potássio (STRASINGER, 1996).

Partindo do rim, a urina inicia sua caminhada para o exterior, descendo pelo ureter, chegando à bexiga e sendo eliminada pela uretra. O volume da urina depende da quantidade de água excretada pelos rins. A água é o principal constituinte do organismo e, portanto, a quantidade excretada em geral é determinada pelo estado de hidratação do corpo. Os fatores que influenciam o volume de urina são: ingestão de fluidos, perda de fluidos por fontes não renais, variação na secreção do hormônio antidiurético e necessidade de excretar grandes quantidades de solutos, como glicose e sais. Desta forma, é função do rim controlar o volume de líquidos e de sais no organismo, exercendo grande influência sobre a pressão arterial e venosa (ZATZ, 2002).

A HCTZ é um fármaco diurético utilizado no tratamento de doenças edematosas e hipertensão arterial sistêmica, entre outras, causando um aumento do fluxo urinário. Quando utilizada no tratamento da hipertensão, a queda inicial observada na pressão arterial é devida a uma redução do volume sanguíneo em consequência da diurese. Desta forma, o efeito diurético e anti-hipertensivo da HCTZ está ligado ao volume urinário e a excreção de eletrólitos (RANG; DALE; RITTER, 2007).

O modelo animal é usado em todos os campos da pesquisa biológica nos dias de hoje. A relação entre os humanos e os animais de outras espécies ganhou contornos mais definidos, a exploração de outras espécies tem regras e uma ética estabelecida, a indução dos resultados do animal para a espécie humana tem critérios claros e objetivos a serem preenchidos (FAGUNDES e TAHA, 2004; VIEIRA et al., 1998).

Existem na literatura diversos trabalhos utilizando modelos animais para verificar o efeito diurético de substâncias ativas, sendo que a maioria utiliza a HCTZ como controle positivo para avaliar a diurese de extratos vegetais (BENJUMEA et al., 2005; NEDI;

MEKONNEN; URGA, 2004; NOLDIN et al., 2003; PESTEL; KRZYKALLA; WECKESSER, 2007; SRIPANIDKULCHAI et al., 2001).

Drogas e toxinas exercem seu efeito sobre o organismo devido às vias metabólicas usadas, ao mecanismo de metabolização, a maneira como seus metabólitos são distribuídos e ligados aos fluidos e tecidos corporais, como e quando são finalmente excretadas. O metabolismo de pequenos roedores é muitas vezes mais rápido do que o de humanos. Os órgãos viscerais que controlam e exercem o metabolismo crescem mais devagar do que o tamanho corporal como um todo (FAGUNDES e TAHA, 2004).

O objetivo deste capítulo foi analisar o efeito diurético da HCTZ após a administração das suspensões em ratos, através da medida do volume urinário e da determinação de eletrólitos, e os resultados deste estudo estão apresentados no presente capítulo.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Departamento de Farmacologia do Curso de Farmácia (UFSC), sob supervisão do Prof. Dr. Jamil Assreuy.

Foram testadas as suspensões de HCTZ contendo solução de CMC-Na 0,6 % (F2) e HPMC 0,8 % (F4). O efeito diurético do fármaco foi verificado através do volume urinário e da determinação de eletrólitos.

2.1 Animais

Para o estudo foram utilizados animais da espécie *Ratus norvegicus*, linhagem wistar do sexo feminino e peso de 200-220 g, mantidos antes do início dos testes no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia em grupos de 6 animais por caixa.

Os animais foram alimentados com uma dieta balanceada e água filtrada à vontade. As condições ambientais foram mantidas em ciclos de luz claro/escuro 12/12h em ambiente climatizado. Na noite anterior ao experimento os animais tiveram livre acesso à água.

O cuidado no manuseio dos animais foi realizado de acordo com guias internacionais para uso de animais, e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (P00053/CEUA e 23080.015492/2006-94/CEUA/UFSC). O parecer encontra-se no anexo 1.

2.2 Ação diurética

Para determinação da diurese foi utilizado método modificado por Kau; Keddie e Andrews (1984). Os animais, após livre acesso a água, receberam uma dose de solução salina (5 % do peso corporal) 30 minutos antes do início dos experimentos, a fim de manter um nível uniforme de água e sais. Após este período, os animais foram divididos em 6 diferentes grupos experimentais, sendo 4 animais em cada grupo, conforme tabela 22.

Tabela 22. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos

Grupo	Tratamento
1	Glicerina e água ⁽⁻⁾
2	HCTZ (2,5 mg/mL), glicerina e água ⁽⁺⁾
3	Solução de CMC-Na 0,6 % e glicerina ⁽⁻⁾
4	Suspensão de HCTZ (2,5 mg/mL) e CMC-Na 0,6% (F2)
5	Solução de HPMC 0,8 % e glicerina ⁽⁻⁾
6	Suspensão de HCTZ (2,5 mg/mL) e HPMC 0,8 % (F4)

(+) controle positivo

(-) controle negativo

Os grupos 1, 3 e 5 foram utilizados como controle negativo. No grupo 1 a mesma quantidade de glicerina utilizada nas formulações previamente desenvolvidas foi dissolvida em água, enquanto que nos grupos 3 e 5 foram utilizadas as soluções poliméricas sem o fármaco. Como não existe uma forma farmacêutica líquida de HCTZ disponível comercialmente, no grupo 2 foi utilizada uma dispersão da HCTZ somente em água, como controle positivo, para comparar o efeito diurético com as suspensões desenvolvidas. Nos grupos 4 e 6 foram utilizadas as formulações teste contendo HCTZ, cuja metodologia de preparo foi previamente descrita no capítulo III.

As formulações contendo HCTZ e as soluções de controle negativo foram administradas na dose de 10 mg/kg e 10 ml/kg, respectivamente, por gavagem, com o animal previamente imobilizado, com uma seringa de tamanho adequado e com cânula arredondada. A via oral foi a de escolha para a realização deste experimento uma vez que o objetivo deste foi avaliar qual o comportamento desta formulação como diurético, e na clínica este fármaco é utilizado por seres humanos por esta via. Dessa forma, a mimetização com a administração em seres humanos é importante para que os parâmetros em estudo possam ser avaliados.

Após o tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais durante 8 horas. Estas gaiolas são equipadas com telas metálicas para que não ocorra contato da urina com as fezes do animal, prevenindo a contaminação da amostra. Ao término do tempo, a urina foi coletada e o volume medido com proveta graduada de 10 mL.

A ação diurética do fármaco foi verificada através de fórmula proposta por Nedi e colaboradores (2004):

(equação 7)

$$\text{Ação Diurética} = \text{EU}_{\text{trat}} / \text{EU}_{\text{contr}}$$

Em que:

EU_{trat} = excreção urinária do grupo que recebeu tratamento

EU_{contr} = excreção urinária do grupo controle negativo

2.2.1 Determinação de eletrólitos

A determinação de eletrólitos na urina dos ratos foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário sob supervisão da Prof^a.Dr^a. Maria Rovaris.

A urina obtida dos animais após 8 h de tratamento foi utilizada para determinar a excreção de íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-). O procedimento foi realizado utilizando equipamento de fotometria de chama Wiener modelo BC-3000.

A quantidade de íons eliminados na urina após 8 horas de tratamento foi calculada de acordo com o volume urinário de cada grupo e expressa como mEq total.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente utilizando teste ANOVA, admitindo-se um nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dose de 10mg/kg é descrita na literatura como a de efeito máximo da HCTZ como diurético em ratos (BENJUMEA et al., 2005). Sendo assim, as suspensões desenvolvidas, bem como a HCTZ dispersa somente em água foram administradas em ratos nesta dose e as medidas de volume urinário obtidas após 8 horas bem como a ação diurética podem ser visualizadas na tabela 23.

Tabela 23. Estudo comparativo de diversas apresentações de HCTZ no volume urinário.

Grupos	Volume Urinário ^a (mL/8h)	Ação Diurética ^b
1	6,63 ± 0,75	—
2	11,75 ± 0,64*	1,77
3	5,88 ± 0,75	—
4	11,0 ± 1,47*	1,87
5	6,88 ± 0,85	—
6	11,75 ± 0,96*	1,70

^a cada valor representa a média ± DPR (%) de 4 animais.

^b Ação diurética: excreção urinária do grupo tratado / excreção urinária do grupo controle (8 h).

* diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle negativo (p<0,05).

Verifica-se um aumento de mais de 50 % no volume urinário nos animais tratados com HCTZ em comparação com os grupos de controle negativo, confirmando assim o efeito diurético do fármaco nas diferentes formulações. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que os grupos tratados (4 e 6) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes do grupo de controle positivo (2) ($F_{\text{calculado}} = 0,6$; $F_{\text{crítico}} = 4,2$ para p<0,05).

A partir do volume urinário foi calculada a ação diurética da HCTZ. Para o grupo de controle positivo a ação diurética encontrada foi de 1,77, enquanto que para as formulações contendo CMC-Na e HPMC a ação diurética foi de 1,87 e 1,70, respectivamente. Estes dados demonstram uma maior ação diurética da formulação contendo CMC-Na (grupo 4), o que pode ser devido à maior estabilidade física desta formulação (dados descritos no capítulo III) quanto à redispersibilidade, e conseqüentemente maior precisão na dosagem.

Com relação à excreção de eletrólitos os valores obtidos em mEq/L na análise bioquímica foram convertidos para mEq total, dependendo do volume urinário excretado em cada grupo (tabela 23). Sendo assim, foi constatado um aumento na excreção de sódio, potássio e cloreto nos animais tratados com as formulações contendo HCTZ (grupos 2, 4 e 6).

Em comparação com seus respectivos grupos de controle negativo, o grupo de animais que recebeu HCTZ dispersa em água teve um aumento na excreção urinária de Na⁺ de 56 %, enquanto que para K⁺ e Cl⁻ ocorreu um aumento de 27,6 e 43,9 %, respectivamente. O grupo que recebeu a suspensão de HCTZ dispersa em CMC-Na teve um aumento na excreção de Na⁺, K⁺, e Cl⁻ de 62,3, 51,1 e 48,4 %, enquanto que no grupo que recebeu a suspensão contendo HPMC o aumento foi de 43, 35,6 e 42 %, respectivamente.

Os dados estão descritos na tabela 24, e podem ser melhor visualizados na figura 26.

Tabela 24. Estudo comparativo de diversas apresentações de HCTZ na excreção de eletrólitos

Grupos	Na ⁺		K ⁺		Cl ⁻	
	mEq/L	mEq total ^a	mEq/L	mEq total ^a	mEq/L	mEq total ^a
1	150,1	0,99 ± 0,12	104,5	0,68 ± 0,05	704,7	4,7 ± 0,54
2	191,2	2,25 ± 0,27*	79,6	0,94 ± 0,13*	712,7	8,38 ± 0,62*
3	140,1	0,82 ± 0,13	75,7	0,44 ± 0,05	710,2	4,17 ± 0,56
4	198,5	2,18 ± 0,32*	82,1	0,9 ± 0,13*	735,6	8,4 ± 0,99*
5	170,9	1,18 ± 0,18	81,4	0,56 ± 0,08	709,5	4,87 ± 0,59
6	176,3	2,07 ± 0,12*	74,7	0,87 ± 0,06*	714,0	8,08 ± 0,57*

^a cada valor representa a média ± Desvio Padrão Relativo de 4 animais.

* diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle negativo (p<0,05).

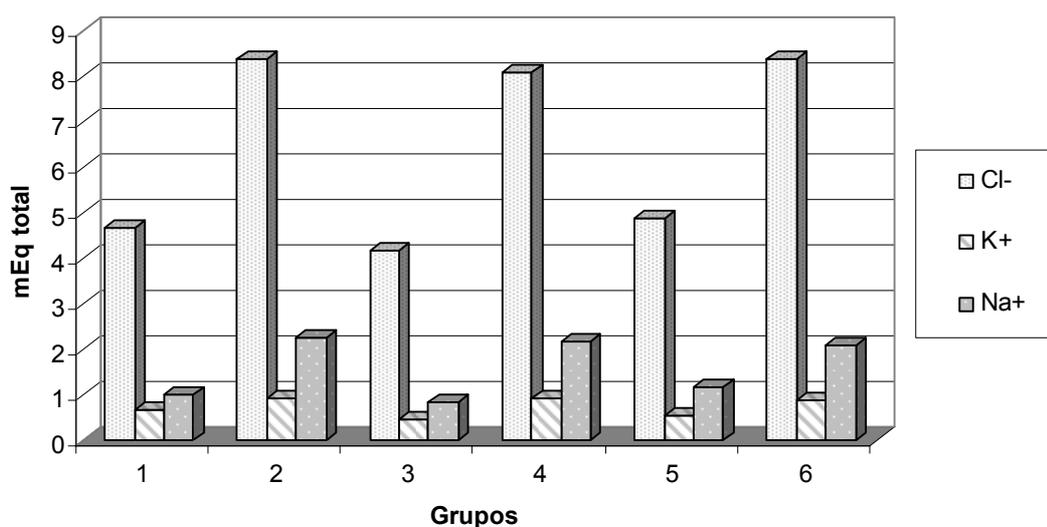


Figura 26. Excreção de Cl⁻, K⁺ e Na⁺ nos grupos 1 a 6.

A análise de variância (ANOVA) confirmou que não existe diferença estatisticamente significativa na excreção de eletrólitos entre os grupos que receberam tratamento com o controle positivo (grupos 2, 4 e 6) ($F_{\text{calculado}} = 0,21; 0,31; 0,55$ para Cl⁻, K⁺ e Na⁺, respectivamente; $F_{\text{crítico}} = 4,2; p < 0,05$).

Dados da literatura confirmam este efeito diurético da HCTZ. Benjumea e colaboradores (2005), analisando o efeito diurético de plantas utilizando HCTZ como fármaco padrão, encontrou um aumento na excreção urinária de eletrólitos de cerca de 50 % em ratos normais tratados após dose única de 10mg/kg de HCTZ.

Desta forma, confirma-se a eficácia das formulações F2 e F4 desenvolvidas com relação ao efeito diurético em ratos.

4. CONCLUSÕES

Os grupos tratados com as formulações F2 e F4 apresentaram aumento no volume urinário bem como na excreção de sódio, potássio e cloreto, em comparação com os grupos controle negativo;

Em comparação com o grupo controle positivo, contendo apenas HCTZ, as suspensões testadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na ação diurética e na excreção de eletrólitos, atestando sua eficácia;

Apesar de não ser verificada diferença estatística nos resultados dos grupos que receberam tratamento, a formulação contendo CMC-Na apresentou os melhores resultados com relação à ação diurética.

5. REFERÊNCIAS

BENJUMEA, D.; ABDALA, S.; HERNANDEZ-LUIS, F.; PÉREZ-PAZ, P.; MARTIN-HERRERA, D. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 205-209, 2005.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, 2004.

KAU, S. T.; KEDDIE, J. R.; ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 11, n. 1, p. 67-75, 1984.

NEDI, T.; MEKONNENA, N.; URGAB, K. Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 57-61, 2004.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

PESTEL, S.; KRZYKALLA, V.; WECKESSER, G. Measurement of glomerular filtration rate in the conscious rat. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 56, n. 3, p. 277-289, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 920 p.

SRIPANIDKULCHAI, B.; WONGPANICH, V.; LAUPATTARAKASEM, P.; SUWANSAKSRI, J.; JIRAKULSOMCHOK, D. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 185-190, 2001.

STRASINGER, K. S. **Uroanálise: fluidos biológicos**. 3. ed. São Paulo: Ed. Premier, 1996.

VIEIRA S.; HOSSNE W. S. **A ética e a metodologia**. São Paulo: Ed Pioneira; 1998.

ZATZ, R. **Fisiopatologia renal**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

CAPÍTULO VI

**ENSAIO CLÍNICO COM PACIENTES PEDIÁTRICOS DO HOSPITAL
INFANTIL JOANA DE GUSMÃO**

1. INTRODUÇÃO

Estudo ou ensaio clínico é qualquer investigação em seres humanos com o intuito de descobrir ou verificar os efeitos clínicos, farmacológicos e/ou outros efeitos farmacodinâmicos do produto estudado, identificar qualquer evento adverso a este, além de estudar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do mesmo com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia. A execução de um estudo clínico está baseada no rígido cumprimento das normas contidas no protocolo de pesquisa (REIS e MAGGI, 2001).

Um estudo clínico aberto é aquele no qual todas as partes envolvidas (paciente, médico e coordenador) são informadas sobre qual medicamento e a dose utilizada por cada um dos participantes. Em um estudo aberto não se utiliza placebo. Já no estudo cego pelo menos uma das partes envolvidas (médico ou paciente) não tem conhecimento sobre qual o produto ou dose está sendo administrado para cada um dos participantes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA, 2007).

1.1 Legislação

Todo protocolo de pesquisa envolvendo seres humanos deve ser desenhado dentro das regulamentações internacionais que garantam a correta realização da pesquisa dentro de padrões éticos, científicos e de respeito ao paciente, exigidos pela comunidade leiga e científica (VIEIRA, 2003).

Muitas pessoas ficam relutantes e inseguras em participar de estudos clínicos. Esta percepção é resultado do que aconteceu no passado, na época da Segunda Guerra Mundial, quando os médicos nazistas se utilizavam dos prisioneiros para realizar experimentos, sem que estes desejassem. As atrocidades realizadas naquela época resultaram em um importante documento de proteção a quem participa de pesquisa clínica: o Código de Nuremberg (1947). Este documento deixa claro que a participação em estudos clínicos deve ser voluntária e que o paciente pode deixar o estudo clínico a qualquer momento.

Na Finlândia, em 1964 durante a 18ª Assembléia da Associação Médica Mundial, foi adotada a Declaração de Helsinque, um conjunto de recomendações ou princípios básicos que norteiam os médicos na conduta ética para a condução de pesquisa biomédica envolvendo seres humanos.

O ICH também publicou um guia referente a ensaios clínicos em crianças, o *Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population*. As recomendações incluem os procedimentos requeridos para garantir a segurança e o bem estar dos sujeitos envolvidos em pesquisa clínica, como o consentimento livre e esclarecido e a aprovação dos protocolos por um comitê de ética (ICH, 2000).

Além das normas internacionais, os países têm leis próprias sobre pesquisas clínicas. No Brasil, em 1996, o Conselho Nacional de Saúde estabeleceu a principal regulamentação em pesquisa clínica, a Resolução 196/96. Esta regulamentação estabelece órgãos nacionais que aprovam e acompanham as pesquisas e visam principalmente a proteção do sujeito de pesquisa: os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo independente constituído por profissionais médicos e não médicos, responsável por verificar a integridade do estudo e garantir a proteção dos direitos, segurança e bem estar dos pacientes envolvidos em um estudo, bem como pela garantia da segurança pública dessa proteção, através da revisão e aprovação do protocolo de pesquisa e do termo de consentimento livre e esclarecido, e da análise da adequabilidade dos pesquisadores, das instalações e dos métodos e materiais utilizados na pesquisa. Além disso, a resolução 196/96 especifica que em pesquisas envolvendo crianças e adolescentes deverá haver justificativa clara da escolha dos sujeitos da pesquisa, especificada no protocolo, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e cumprir as exigências do consentimento livre e esclarecido, através dos representantes legais dos referidos sujeitos, sem suspensão do direito de informação do indivíduo, no limite de sua capacidade. Complementando a resolução 196/96 foi publicada a resolução 251/97 que estabelece normas no que diz respeito a pesquisas com fármacos, medicamentos e vacinas.

1.2 Formulações pediátricas anti-hipertensivas

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença definida pela persistência de níveis de pressão arterial acima de valores arbitrariamente definidos como limites de normalidade. Segundo o 4º Relatório publicado pelo *National High Blood Pressure Education Program* (NHBPEP), somente é feito o diagnóstico de hipertensão em crianças, após a certificação de que a média da pressão sistólica e/ou diastólica, em mais de três ocasiões distintas, é maior ou igual ao nível pressórico correspondente ao 95 percentil (observado sexo, idade e percentil de altura) de uma população de referência (NHBPEP 2005; SANTOS et al., 2003).

Como doença do adulto de alta mortalidade que pode ter seu início na infância e na adolescência, a HAS tem sido uma das afecções mais estudadas em toda a medicina (KOCH, 2003; MOURA et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2007).

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico, muito utilizada em pacientes pediátricos em casos de hipertensão e doenças edematosas, apesar de não haver uma forma farmacêutica líquida disponível comercialmente. A dificuldade de deglutição de medicamentos sólidos pelas crianças e a ausência de formulações com dosagens adequadas fazem das preparações líquidas orais anti-hipertensivas uma importante alternativa utilizada em muitos hospitais; porém, na maioria das vezes, sem um parecer científico.

Desta forma, a proposta do estudo foi incorporar uma suspensão previamente desenvolvida (capítulo III) contendo HCTZ na rotina do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) e verificar a alteração da pressão arterial e da diurese nos pacientes que receberam a prescrição deste medicamento. Com a análise dos parâmetros clínicos, foi verificada a evolução do paciente, e conseqüentemente, a eficácia da formulação.

2. METODOLOGIA

2.1 Desenho do estudo

O presente estudo foi desenvolvido com pacientes pediátricos internados no HIJG com hipertensão ou outras patologias em que houve a prescrição de HCTZ e que devidamente se adequaram aos critérios de inclusão da pesquisa. Os pacientes foram acompanhados em todo o período de internação onde foi avaliada sua condição clínica, a pressão arterial e a diurese. O estudo foi classificado como sendo unicêntrico e aberto, empregado para verificar a eficácia da formulação desenvolvida. A pesquisa teve início em agosto de 2007, quando a suspensão de HCTZ foi introduzida na rotina da farmácia do hospital e teve fim em novembro de 2007. As crianças serviram de controle para si próprias, através da comparação dos valores de pressão arterial e diurese no momento da internação com os valores após o tratamento com a suspensão de HCTZ. De acordo com o guia para investigação clínica de medicamentos na população pediátrica publicado pela ICH, os estudos devem ser realizados nos pacientes pediátricos doentes, o que pode levar a uma variabilidade maior nos dados, quando comparados com estudos em adultos sadios, porém, estes refletem melhor o uso clínico do medicamento (ICH, 2000).

2.2 Questões de ordem ética

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número 259/2006), conforme estabelece a legislação. O parecer encontra-se no anexo 2.

2.2.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os responsáveis legais pelas crianças receberam informações detalhadas sobre a pesquisa em linguagem acessível contendo a justificativa, os objetivos e os procedimentos a serem utilizados, assim como os desconfortos, os riscos possíveis e os benefícios esperados, segundo as recomendações dos termos das resoluções número 196 de 10/10/1996 e 251 de 07/08/1997 do Conselho Nacional de Saúde, a respeito da pesquisa em seres humanos, sendo obtido o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" (anexo 3).

2.3 Caracterização do local da pesquisa

A presente pesquisa foi desenvolvida no Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), que foi inaugurado em Março de 1979, em Florianópolis. Atualmente o Hospital é mantido pelo Estado através da Secretaria de Saúde. Possui uma área de 22.000 m² dividido em unidades de internação, berçário, emergência interna e externa, isolamento, oncologia, queimados, unidade de terapia intensiva geral e neonatal. As unidades são especializadas em cardiologia, cirurgias (pediátrica, geral, plástica, oftalmológica, ortopédica, otorrinolaringológica, urológica), desnutrição entre outros serviços. O hospital conta com 138 leitos ativos, atendendo crianças na faixa etária de zero a quinze anos incompletos, através do Sistema Único de Saúde, de convênios e consultas particulares. Apesar de não fazer distinção quanto ao nível sócio econômico das famílias, a maioria da sua clientela é de baixo poder aquisitivo, atendendo crianças provenientes de todo o Estado de Santa Catarina e demais Estados da região sul (SECRETARIA DA SAÚDE, 2007).

2.4 Critérios de inclusão

As crianças foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- Dar entrada no hospital no período de agosto a novembro de 2007;
- Apresentarem prescrição do médico responsável incluindo HCTZ para uso no próprio hospital;
- Apresentarem o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável legal.

2.5 Tamanho de amostra

Foi utilizado para o estudo um tamanho de amostra de conveniência e não probabilística. Foram incluídos na pesquisa todos os pacientes que passaram pelo critério de inclusão no período de agosto a novembro de 2007.

2.6 Variáveis estudadas

As variáveis analisadas no estudo incluíam:

- Sexo
- Idade
- Peso
- Altura

- Pressão arterial sistêmica aferida pela equipe de enfermagem
- Diurese calculada pela equipe de enfermagem
- Relação tratamento/evolução da patologia, obtidos através dos prontuários.

2.7 Tratamento dos sujeitos

As crianças participantes do estudo foram tratadas de acordo com a prescrição médica.

A suspensão de HCTZ (2,5 mg/mL) dispersa em 0,6 % de CMC-Na (F2) foi a escolhida para a realização do estudo clínico, devido aos melhores resultados obtidos durante a caracterização físico-química e microbiológica (capítulo III) e na avaliação da ação diurética em animais (capítulo V).

A frequência de preparo do medicamento foi conforme a demanda, observando-se o prazo de validade calculado previamente (capítulo IV).

2.8 Avaliação clínica

No período de estudo foram rigorosamente analisadas quaisquer alterações, de acordo com as condições relacionadas a cada patologia envolvida. Avaliou-se também a presença ou não de sinal ou sintoma possivelmente relacionado a um efeito colateral atribuído à HCTZ, como arritmias ventriculares devido à redução de potássio plasmático, alcalose metabólica, aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico e hiperglicemia (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO ARTERIAL, 2006; SWEETMAN, 2007).

Cada paciente tinha sua própria ficha clínica do hospital, de onde foram obtidas as informações necessárias. Este documento é confidencial e contém os dados referentes ao acompanhamento do paciente.

A pressão arterial foi aferida pela equipe de enfermagem de hora em hora, durante todo o período de internação dos pacientes, sendo utilizada como parâmetro a pressão arterial sistólica. Foram consideradas com níveis pressóricos elevados ou supostamente hipertensas as crianças que atingiram níveis pressóricos sistólicos maiores ou iguais aos valores correspondentes ao percentil 95 das tabelas do 4º Relatório do NHBPEP (2005). As

curvas do percentil de altura por idade e sexo seguiram a proposta do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC, 2007).

O cálculo da diurese foi realizado após pesagem de fraldas e cálculo da quantidade de líquidos administrados e eliminados em 24 h, sendo expressa em mL/kg/h.

Foram analisadas as médias aritméticas das pressões arteriais aferidas em 24 h e a diurese diária dos pacientes nos períodos pré e durante o tratamento. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente utilizando teste ANOVA, admitindo-se um nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 7 pacientes que se adequaram aos critérios de inclusão do estudo. Os dados de sexo, altura, peso e idade dos participantes estão descritos na tabela 25.

Tabela 25. Dados dos participantes do estudo.

Paciente	Sexo	Altura (cm)	Peso (kg)	Idade (meses)
1	Feminino	55	4,5	5
2	Feminino	46	4,0	2
3	Feminino	60	8,0	7
4	Masculino	57	3,8	3
5	Masculino	49	3,0	2
6	Masculino	50	3,6	2
7	Masculino	50	3,5	2

Os dados da tabela foram utilizados em conjunto com a medida de pressão arterial para classificar os pacientes como hipertensos, pré-hipertensos ou normais, de acordo com tabela publicada pelo NHBPEP (2005).

Os pacientes permaneceram internados na UTI geral durante o estudo.

A dose diária administrada da suspensão de HCTZ variou de criança para criança, sendo justificada pela heterogeneidade da amostra em relação à idade, peso, superfície corporal, sexo e gravidade da patologia a ser tratada.

De acordo com os prontuários, não foram verificados efeitos colaterais ou reações adversas ao medicamento.

Os dados de pressão arterial obtidos no estudo clínico dos pacientes 1 a 7 podem ser visualizados na figura 27. Cada ponto corresponde à média de 24 aferições de pressão arterial. Como forma de padronização, foram plotados dados de um período de 10 dias de estudo, sendo a primeira aferição realizada no dia de internação. Isto porque em 10 dias de tratamento foi constatado que os pacientes apresentaram queda e estabilização da pressão arterial, demonstrando o efeito anti-hipertensivo do fármaco.

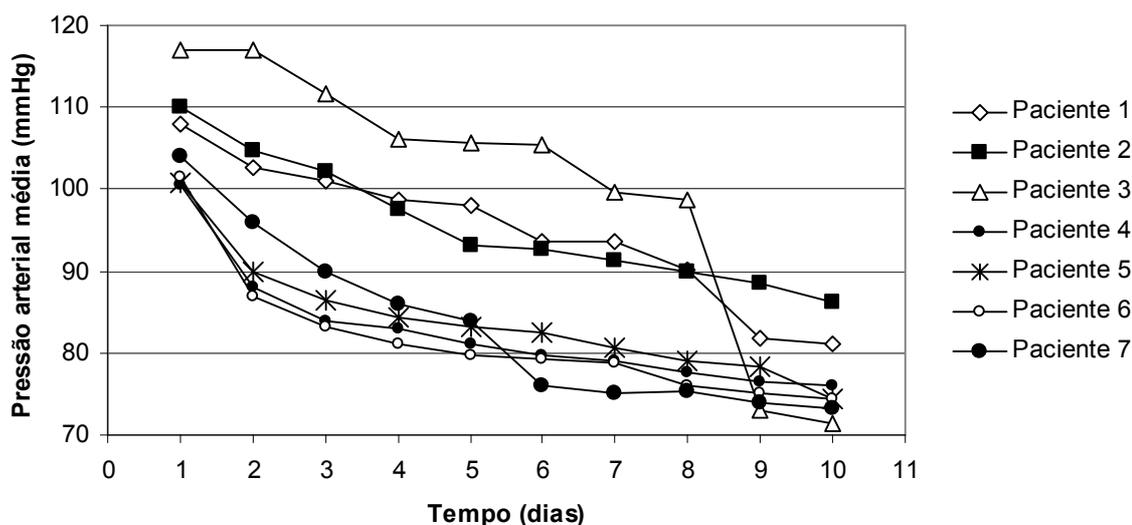


Figura 27. Evolução da pressão arterial nos pacientes 1 - 7 após tratamento com suspensão de HCTZ 2,5 mg/mL.

Analisando a figura, verifica-se que a média da pressão arterial medida no dia da internação é maior nos pacientes do sexo feminino (1, 2 e 3) do que nos do sexo masculino (4, 5, 6 e 7), fato este que é descrito na literatura (V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2006).

No momento da internação, todos os pacientes foram classificados como hipertensos, apresentando valores de pressão arterial sistólica acima do percentil 95 para respectiva idade, sexo e altura. Entretanto, ao fim de 10 dias de estudo ocorreu uma diminuição da pressão arterial abaixo do percentil 90, sendo classificada como normotensão (pressão arterial normal).

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa entre os pacientes em tratamento ($F_{\text{calculado}} = 6,2$; $F_{\text{crítico}} = 2,2$, $p < 0,05$). Esta diferença é atribuída à heterogeneidade dos sujeitos participantes do estudo.

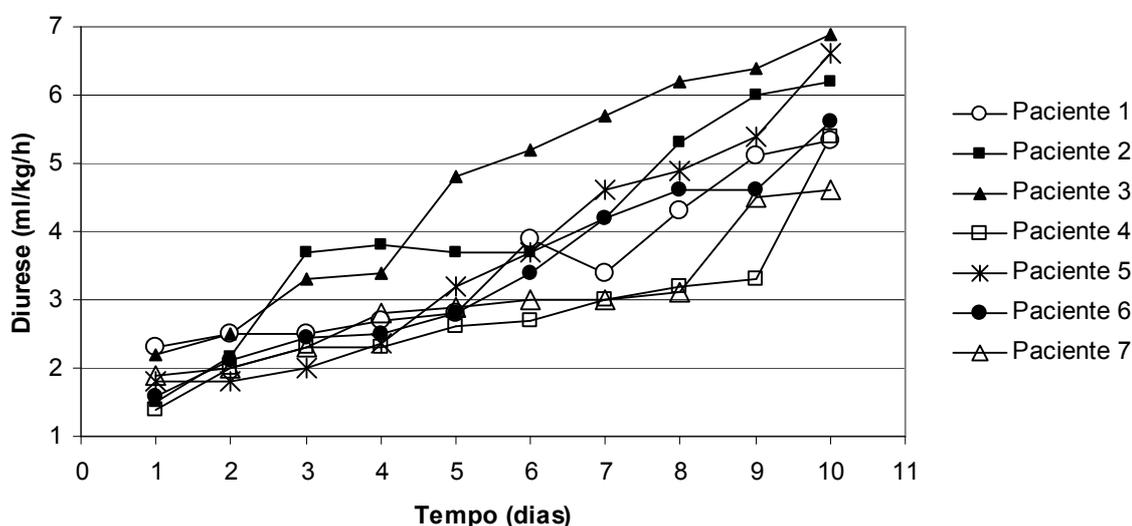
Todos os pacientes classificados como hipertensos receberam tratamento com HCTZ devido à hipertensão arterial secundária, provocada pela patologia diagnosticada de acordo com a tabela 26 ou por outros medicamentos utilizados no tratamento da mesma.

Tabela 26. Relação de patologias por paciente participante do estudo.

Paciente	Patologia
1	Bronquiolite aguda
2	Bronquiolite
3	Síndrome do intestino curto e Fibrose cística
4	Cardiopatía congênita grave
5	Bronquiodisplasia pulmonar
6	Cardiopatía congênita grave
7	Cardiopatía congênita grave

Desta forma, de acordo com os resultados verificou-se a eficácia da formulação na redução da pressão arterial dos pacientes para valores normais.

Com relação à eliminação de líquidos provocada pela HCTZ, pode-se observar na figura 28 um aumento da diurese após 10 dias de tratamento, fato que confirma a ação diurética do fármaco, e atesta sua eficácia clínica. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que neste caso não existe diferença estatisticamente significativa entre os pacientes ($F_{\text{calculado}} = 2,08$; $F_{\text{crítico}} = 2,24$ para $p < 0,05$).

**Figura 28.** Diurese calculada após tratamento com HCTZ 2,5 mg/mL.

Apesar dos resultados satisfatórios, há que se citar que todos os pacientes receberam polimedicação devido à gravidade das patologias, fato este que pode ter interferido no resultado final, que pode não ser devido exclusivamente à ação diurética da HCTZ.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, tendo como base o referencial teórico e respeitando as limitações do estudo proposto pode-se concluir que a evolução tratamento/eficácia foi satisfatória em atingir níveis pressóricos normais em relação à altura, peso, idade e sexo, assim como no aumento da diurese dos pacientes;

Não foi verificado nenhum efeito colateral ou reação adversa relacionados ao medicamento em estudo;

A polimedicação foi um fator limitante do estudo para garantir que a eficácia clínica esteja relacionada somente a hidroclorotiazida, porém os resultados mostram que a inclusão do medicamento estudado auxiliou na melhora dos pacientes.

5. REFERÊNCIAS

CDC - Center of Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. Disponível em < <http://www.cdc.gov/growthcharts/>>. Acesso em doze de dezembro de 2007.

Conselho nacional de Saúde. Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996. **Pesquisas em Seres Humanos**. Diário oficial, Brasília, 12 de novembro de 1996.

Conselho nacional de Saúde. Resolução nº 251 de 7 de agosto de 1997. **Pesquisas com Fármacos, Medicamentos e Vacinas**. Diário oficial, Brasília, 23 de setembro de 1997.

DECLARATION OF HELSINKI - WORLD MEDICAL ASSOCIATION, Finland, 1964. Disponível em: <http://history.nih.gov/laws/pdf/helsinki.pdf>. Acesso em oito de janeiro de 2008.

V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSAO. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2006.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **E11-Clinical investigation of medicinal products in the pediatric population**, 2000.

KOCH, V. H. Casual blood pressure and ambulatory blood pressure measurement in children. **São Paulo Medical Journal**, v. 121, n. 2, p. 85-89, 2003.

MOURA, A. A.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, M.; RIVERA, I. R. Prevalência de pressão arterial elevada em escolares e adolescentes de Maceió. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n.1, p. 35-40, 2004.

NHBPEP - National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. **The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents**. National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, Maryland. National Institute of Health, 2005.

NOGUEIRA, P. C. K.; COSTA, R. F.; CUNHA, J. S. N.; SILVESTRINI, L.; FISBERG, M. Pressão arterial elevada em escolares de santos – relação com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n.5, p. 426-32, 2007.

REIS, A. M. M.; MAGGI, A. R. S. Pesquisa clínica com medicamentos. Em: GOMES, M. J. M.; REIS, A. M. M. **Ciências Farmacêuticas. Uma abordagem em farmácia hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2001.

SANTOS, A. A. C.; ZANETTA, D. M. T.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. O diagnóstico da hipertensão arterial na criança e no adolescente. **Pediatria**, v. 25, n. 4, p. 174-83, 2003.

SWEETMAN, S. C. (Ed), **Martindale: The Complete Drug Reference**. Pharmaceutical Press, London, UK, (electronic version) Disponível em: <<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/>>, Acesso em 02 de agosto de 2007.

SECRETARIA DA SAÚDE, Hospital Infantil Joana de Gusmão. Disponível em <<http://www.saúde.sc.gov.br/hijg>>. Acesso em dois de dezembro de 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA. Disponível em: <<http://www.sbppc.org.br/portal/index>>. Acesso em dois de dezembro de 2007.

TRIBUNAL INTERNACIONAL DE NUREMBERG - 1947 Trials of war criminal before the Nuremberg Military Tribunals. **Control Council Law**, v. 10, n. 2, p.181-182, 1949.

VIEIRA, V. A. Hipertensão arterial e aspectos éticos em pesquisa envolvendo seres humanos: implicações para a área da saúde. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.3, n. 4, p. 481-488, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidas suspensões farmacêuticas contendo HCTZ para uso pediátrico, e realizado o controle de qualidade físico-químico e microbiológico das mesmas. A justificativa do trabalho foi baseada na falta de uma formulação líquida para uso em crianças internadas no HIJG.

A princípio, foi realizada a caracterização físico-química dos principais constituintes das formulações, ou seja, o fármaco (HCTZ) e os polímeros (CMC-Na e HPMC). Estes foram avaliados quanto às especificações farmacopéicas e através de técnicas termoanalíticas, demonstrando qualidade adequada para uso nas formulações desenvolvidas.

A seguir, as suspensões foram preparadas e submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas. A etapa físico-química consistiu na determinação das características organolépticas, pH, potencial zeta, tamanho de partícula, volume de sedimentação, redispersibilidade, avaliação do comportamento reológico e doseamento de HCTZ. Na caracterização microbiológica das suspensões foi realizada a contagem de viáveis totais, pesquisa de patógenos específicos, e o teste do desafio para verificar a eficácia do conservante. De acordo com os resultados obtidos, foi possível destacar a formulação F2, contendo 0,6 % de CMC-Na como a mais adequada para uso pediátrico.

Na avaliação da estabilidade físico-química, todas as formulações sofreram uma queda da viscosidade aparente inicial e do pH, sendo mais acentuada quando armazenadas em estufa a 40 °C. Através de um estudo de estabilidade acelerado, foi possível estabelecer um prazo de validade para as formulações F1, F2, F3 e F4 de 190, 188, 185 e 124 dias, respectivamente, armazenadas em temperatura ambiente a 25 °C.

A avaliação da ação diurética das formulações F2 e F4 em ratos permitiu a visualização do aumento no volume urinário bem como na excreção de sódio, potássio e cloreto, nos animais tratados em comparação com os grupos controle negativo. Em comparação com o grupo controle positivo, contendo apenas HCTZ, as suspensões testadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na ação diurética e na excreção de eletrólitos, atestando sua eficácia.

No estudo clínico com pacientes pediátricos internados no HIJG pode-se concluir que a evolução tratamento/eficácia foi satisfatória em atingir níveis pressóricos normais em relação à altura, peso, idade e sexo, assim como no aumento da diurese dos pacientes. A

partir disto, a formulação F2 foi considerada apta a ser incluída na rotina do Hospital Infantil Joana de Gusmão.

De acordo com os resultados deste trabalho, pode-se verificar que o desenvolvimento de formulações pediátricas é um desafio a ser vencido, devido à necessidade imediata de formas farmacêuticas líquidas em hospitais. Desta forma, estudos desta natureza contribuem para a qualidade do medicamento, garantindo segurança e eficácia para a população.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



ANEXO 2

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES
HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**



ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA**
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA
TEL.: (48) 331-9350-FAX.: (48) 331-9542

Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, MONIKA PIAZZON TAGLIARI e equipe anteriormente denominada, iremos desenvolver a pesquisa **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SUSPENSÃO ORAL CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA. AVALIAÇÃO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS NO HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO”**, com o objetivo de avaliar a eficácia da formulação anti-hipertensiva manipulada para o Hospital Infantil Joana de Gusmão, na tentativa de proporcionar uma melhora no atendimento e na qualidade de vida dos pacientes internados no Serviço de Cardiologia.

Sendo este um estudo piloto e considerando a necessidade da população alvo de cuidados especiais, afirmamos que será utilizado um número reduzido de pacientes pediátricos. Os mesmos contarão com o acompanhamento necessário da equipe médica e da enfermagem, além da responsável pela pesquisa. Serão efetuados esclarecimentos sobre os procedimentos, no caso de dúvidas por parte dos responsáveis pelos pacientes. Esta pesquisa será desenvolvida ao longo de dois anos sendo que atenderemos três pacientes por semana. Informamos, ainda, que o paciente não terá qualquer ônus financeiro.

Em caso de dúvidas a respeito do trabalho favor entrar em contato com: **Monika Piazzon Tagliari Fone: 32331436/84015498 Marcos A. Segatto Silva – Fone: 331-9350.**

As informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas na presente pesquisa.

Assinatura-----Coordenador do projeto-----

Eu, _____, responsável pelo paciente _____ aceito participar da presente pesquisa intitulada **“DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SUSPENSÃO ORAL CONTENDO HIDROCLOROTIAZIDA. AVALIAÇÃO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS NO HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO”**.

Florianópolis, ____/____/____

Assinatura_____

RG _____

ANEXO 4

PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO CHROMATOGRAPHIA

Journal Article



Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method to Quantify Hydrochlorothiazide in Oral Suspension for Pediatric Use

Journal	Chromatographia
Publisher	Vieweg Verlag
ISSN	0009-5893 (Print) 1612-1112 (Online)
Status	ONLINE FIRST
Category	Full Short Communication
DOI	10.1365/s10337-008-0546-1
Subject Collection	Chemistry and Materials Science
SpringerLink Date	Saturday, February 09, 2008

Over 30,000 scientific books available on springer.com

Monika Piazzon Tagliari¹ ✉, Hellen Karine Stulzer¹, Fabio Seigi Murakami¹, Gislaine Kuminek¹, Bruno Valente¹, Paulo Renato Oliveira¹ and Marcos Antonio Segatto Silva¹

(1) Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário Trindade, Bloco K, sala 207, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

Received: 8 October 2007 **Revised:** 18 December 2007 **Accepted:** 9 January 2008 **Published online:** 9 February 2008

Abstract A stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography (LC) method was developed and validated for the determination of hydrochlorothiazide in an oral suspension. Isocratic chromatography was performed on a C₁₈ column with 0.1 M sodium phosphate buffer pH 3.0/acetonitrile (70:30 v/v) as mobile phase, at a flow rate of 1.3 mL min⁻¹, and UV detection at 254 nm. The method was linear ($r^2 = 0.9998$), accurate (mean recovery = 100.3%), and precise (RSD <2%). It was also validated for specificity and robustness. The method was successfully applied for the quality control analysis of a new pharmaceutical formulation of HCTZ for pediatric use.

Keywords Column liquid chromatography - Stability-indicating - Validation - Pediatric oral suspension - Hydrochlorothiazide