UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a
degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa

JOSÉ ARTHUR PERES LOPES JÚNIOR

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz

São Paulo
2010

JOSÉ ARTHUR PERES LOPES JÚNIOR

Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a
degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do grau de
Mestre em Fármaco e
Medicamentos

Área de Concentração: Produção e
Controle Farmacêuticos

Orientador: Prof. Dr. Humberto
Gomes Ferraz

SÃO PAULO
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

L864i Lopes Júnior, José Arthur Peres
Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a
degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa / José
Arthur Peres Lopes Júnior. -- São Paulo, 2010.
65p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferraz, Humberto Gomes

1. Tecnologia farmacêutica 2. Cromatografia em líquido de
alta eficiência : Análise química : Farmacologia I. T. II. Ferraz,
Humberto Gomes, orientador.

615.4 CDD

José Arthur Peres Lopes Júnior

Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a degradação
fotolítica do pizotifeno em solução aquosa

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2011.

Aos meus pais, Arthur e Osnilde, pela presença
em todos os momentos importantes, por minha
formação e inspiração.

A minha irmã, Maria Augusta, por me mostrar
que difícil, às vezes, é fazer o simples.
A minha esposa, Renata, por todo amor, carinho
compreensão e incentivo que eu poderia pedir.
Muito obrigado por existirem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz pela oportunidade de fazer o mestrado, pela orientação e pelo incentivo nos momentos mais difíceis, que não foram poucos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela minha formação

À Medley Indústria Farmacêutica Ltda. pelo apoio financeiro e material para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da faculdade Elizabeth Paiva, Jorge Lima e Elaine Ychico pela dedicação.

Especialmente aos meus amigos e pesquisadores da Medley Ana Paula Navarro de Almeida Zerbini e Helder Dario Colmenero de Oliveira pelo apoio, idéias, paciência e criatividade.

Aos colegas do grupo Ana Lúcia Nobusa, Claudinéia Pinto, Fabio Ikuno, Felipe Nambu, Katia Nami, Michele Issa, Missael Silva, Patrícia Rivas e Roxana Flores pelas frutíferas discussões, conversas, amizade e suporte nas horas de maior dificuldade.

A Jussara do Couto Barbutti, coordenadora do setor de Validação, Estabilidade e Desenvolvimento de Embalagens da Medley Indústria Farmacêutica Ltda, a Guilherme Carrara, Assessor Técnico da Merck S.A. Brasil, e Paulo Fellippe V. Guimarães, Gerente de Assistência Técnica da Merck S.A. Brasil, por suas valiosas contribuições no capítulo sobre validação analítica.

A todos os colegas de laboratório de P&D da Medley Indústria Farmacêutica Ltda pelo apoio, idéias, discussões e cafés.

Aos estagiários Patrícia Bosomba, Silmara Macena, Fagner Magalhães, Leandro Giorgetti, Bruno Camardella e Cíntia Alves por todo suporte técnico essencial para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório Mariane Ballerini e Guilherme pelo apoio, convivência e troca de experiências.

Aos meus amigos Álfio, Cléber, David, Davis, Diego, Eduardo, Júlio, Rodrigo e Zé Eduardo, pela torcida e apoio, mesmo distante, e pelas risadas.

Pesquisar é ver o que todos vêem e pensar o que ninguém pensou.

Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt

RESUMO

LOPES Jr., J. A. P.; FERRAZ, H.G. **Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos descobertos há mais de cem anos e utilizados para modificação de propriedades físico-químicas de moléculas, aplicadas especialmente para aumentar/modificar sua solubilidade através da formação de complexos de inclusão tipo hóspede-hospedeiro entre sua cavidade apolar e grupamentos afins das moléculas hóspedes. O sucesso na obtenção dos complexos de inclusão depende muito do método empregado e é necessário conhecer as opções disponíveis para selecionar a melhor relação entre eficiência e rendimento. Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção destes complexos as mais destacadas são a coprecipitação, coevaporação, neutralização, liofilização, *spray-drying*, malaxagem, moagem e fluidos supercríticos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da complexação do pizotifeno (PZT) com ciclodextrinas (CDs) sobre a sua fotodegradação em solução aquosa. Para isso foram utilizados diferentes tipos de CDs (α , β e γ). Adicionalmente, um método analítico indicador de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado. Este método cromatográfico foi avaliado quanto a sua seletividade, linearidade, precisão intermediária, exatidão, estimativas de limites inferiores de quantificação e detecção, robustez e saturação dos filtros. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Wakosil II 5C18 RS, 250mm x 4,6mm (5 μ m). A fase móvel (FM) utilizada consistiu numa mistura de solução aquosa de (NaH_2PO_4 + Pic B8) 2 mmol/l:acetonitrila:triethylamina (600:400:2, v/v) com pH aparente de $3,00 \pm 0,05$. A vazão de trabalho utilizada foi de 1,5 ml/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. O método avaliado mostrou-se capaz de separar o PZT de seus principais produtos de degradação, preciso, exato, satisfatoriamente linear ($r^2 > 0,99$, intercepto-y próximo de zero), robusto quanto ao pH, composição e vazão da FM e a condição de filtração ideal foi através de filtros de PVDF hidrofílico. A mudança na fotoestabilidade do pizotifeno puro e complexado com α , β e γ ciclodextrinas em solução aquosa foi avaliada em câmara de fotoestabilidade sob luz branca e UV por doze dias em frascos de vidro lacrados. Os complexos de inclusão conferiram ao fármaco uma velocidade de degradação no mínimo 19% menor em relação ao PZT puro e uma proteção relativa de até 1,61. A magnitude da fotoproteção foi maior para o complexo formado com β -ciclodextrina independentemente do tipo de radiação.

Palavras Chave: ciclodextrinas, pizotifeno, complexos, fotólise, validação analítica, CLAE.

ABSTRACT

LOPES Jr., J. A. P.; FERRAZ, H.G. **Influence of cyclodextrin complexation over the photolytic degradation of pizotifeno in aqueous solution**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Cyclodextrins (CDs) are oligosaccharides discovered over one hundred years ago and used to change physicochemical properties of molecules, acting especially over its aqueous solubility through the formation of guest-host type inclusion complexes between its apolar cavity and similar structures in the guest molecule. Among the techniques employed to obtain these inclusion complexes the most commonly used are coprecipitation, coevaporation, neutralization, freeze-drying, spray-drying, kneading, grinding and precipitation from supercritical fluids. The objective of the present work was to evaluate the influence of the complexation of pizotifen (PZT) with various CDs (α , β and γ) over its photostability in aqueous solution. Also, a stability indicating high performance chromatographic method was developed and fully validated regarding its selectivity, linearity, intermediate precision, accuracy, lower limits of detection and quantification, robustness and filter saturation. The column used was a Wakosil II 5C18 RS with (250 x 4,6) mm, 5 μ m particle size and kept at 30°C. The mobile phase (MP) used consisted of a mixture of a saline aqueous solution (NaH_2PO_4 + Sodium Octanesulfonate) 2 mmol/l:acetonitrile:triethylamine (600:400:2 v/v) with its apparent pH adjusted to 3 and with a flow rate of 1,5 ml/min. The method was selective regarding PZT peak even among its degradation products and also precise, exact, linear ($r^2 > 0,99$ and y-intercept close to zero), robust regarding MP's pH, composition and flow rate and the best filtration condition was with hydrophilic PVDF. Photostability changes in pure and complexed PZT in aqueous solution inside sealed glass vials were assessed for 12 days under both white and UV light in a photostability chamber regarding PZT's observed degradation rate, half-life and relative protection. Inclusion complexation significantly reduced PZT's degradation constant at least 20%, with equivalent increase in its half-life and a maximum relative protection of 1,61. The most significant protection was observed in the β -CD complex solution for both types of irradiation.

Keywords: cyclodextrin, pizotifen, inclusion complexes, photolysis, analytical validation, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS CICLODEXTRINAS. DEPENDENDO DA QUANTIDADE GLICOSES (N) PODE TER-SE A, B OU γ -CICLODEXTRINA (ADAPTADO DE STELLA E HE, 2008)	17
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FORMATO CILÍNDRICO DE UMA α -CICLODEXTRINA (ADAPTADO DE CHALLA <i>ET AL.</i> , 2005)	18
FIGURA 3: SOLUBILIDADE DE FASES DESCRITA POR HIGUSHI E CONNORS (1965). S_0 E S_c REPRESENTAM A SOLUBILIDADE INTRÍNSECA DO FÁRMACO PURO E A SOLUBILIDADE DO COMPLEXO RESPECTIVAMENTE. A , A_L , A_p , A_N , B , B_1 E B_5 REPESENTAM OS TIPOS DE DIAGRAMAS E SÃO EXPLICADOS NO CORPO DO TEXTO. ADAPTADO DE VEIGA, PECORELLI E RIBEIRO (2006).	20
FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DO PZT.....	33
FIGURA 5. CROMATOGRAMA DA CONDIÇÃO ANALÍTICA SELECIONADA DE UMA AMOSTRA CONTENDO PZT E AMITRIPTILINA (1º E 2º PICOS RESPECTIVAMENTE). O TEMPO DE RETENÇÃO ESTÁ MARCADO EM MINUTOS.	40
FIGURA 6. CROMATOGRAMAS DE AMOSTRAS DE PZT PURO (LINHA SUPERIOR, AZUL) E FOTODEGRADADO (LINHA INFERIOR, VERDE). OS PICOS RELATIVOS AOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO PZT ESTÃO COMPLETAMENTE RESOLVIDOS DO PICO PRINCIPAL, COM UMA PUREZA ESPECTRAL DE 1,000.....	41
FIGURA 7. CURVA DE CONCENTRAÇÃO (EM $\mu\text{g}/\text{ML}$) VERSUS ÁREA DO PICO DE PZT. O INTERVALO DA CURVA ESTÁ REPRESENTADO PELAS CURVAS TRACEJADAS.	41
FIGURA 8. GRÁFICO DOS RESIDUAIS DA REGRESSÃO LINEAR. CONCENTRAÇÃO (EM $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE PZT) VERSUS ÁREA DO PICO DO PZT. O INTERVALO DOS RESÍDUOS ESTÁ REPRESENTADO PELAS CURVAS TRACEJADAS.	42
FIGURA 9. GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES CALCULADAS A PARTIR DA CURVA DE LINEARIDADE (EIXO Y) VERSUS A CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ENSAIO DA EXATIDÃO (EIXO X) COM SEU RESPECTIVO INTERVALO (LINHAS TRACEJADAS). OS VALORES SÃO DADOS EM $\mu\text{g}/\text{ML}$	44
FIGURA 10. GRÁFICO DOS RESÍDUOS DAS CONCENTRAÇÕES CALCULADAS EM RELAÇÃO ÀS CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS COM SEU RESPECTIVO INTERVALO (LINHAS TRACEJADAS). OS VALORES SÃO DADOS EM $\mu\text{g}/\text{ML}$	45
FIGURA 11. RECUPERAÇÃO DE SOLUÇÃO DE PZT 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE ACORDO COM O TIPO DE FILTRO MILLEX E VOLUME DE SATURAÇÃO. (AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM UM DESVIO PADRÃO ACIMA E ABAIXO DO VALOR ENCONTRADO, $N=3$). MEDIDAS FEITAS EM RELAÇÃO À AMOSTRA NÃO FILTRADA.	47
FIGURA 12. RECUPERAÇÃO DE SOLUÇÃO DE PZT 20 $\mu\text{g}/\text{ML}$ E 2 $\mu\text{g}/\text{ML}$ ATRAVÉS DO FILTRO DE CÂNULA DE 10 μm (AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM UM DESVIO PADRÃO ACIMA E ABAIXO DO VALOR ENCONTRADO, $N=3$). MEDIDAS FEITAS EM RELAÇÃO À AMOSTRA NÃO FILTRADA.	47

FIGURA 13. RECUPERAÇÃO DE SOLUÇÃO DE PZT 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DE ACORDO COM O TIPO DE FILTRO E VOLUME DE SATURAÇÃO. (AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM UM DESVIO PADRÃO ACIMA E ABAIXO DO VALOR ENCONTRADO, $N=3$). MEDIDAS FEITAS EM RELAÇÃO À AMOSTRA NÃO FILTRADA.....	47
FIGURA 14. ESTRUTURA QUÍMICA DO MALATO DE PIZOTIFENO.	55
FIGURA 15. AUMENTO DA INTENSIDADE DE TRÊS PICOS DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO AO LONGO DO ESTUDO DE EXPOSIÇÃO À LUZ DE PZT PURO EM 230 NM. AS CURVAS SÃO CRESCENTES E REFEREM-SE ÀS AMOSTRAS ANALISADAS NO INÍCIO (INFERIOR) E APÓS 2, 4, 8 E 12 DIAS NAS CORES PRETO, ROSA, AZUL, VERMELHO E VERDE RESPECTIVAMENTE.	59
FIGURA 16. DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PZT AO LONGO DO TEMPO (DIAS) PARA AS AMOSTRAS DE PZT PURO, A-CPX, B-CPX E Γ -CPX EXPOSTAS À LUZ BRANCA. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O VALOR DE $\log_{10} R(\%)$ (ADIMENSIONAL) E O EIXO HORIZONTAL O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO (EM DIAS).	61
FIGURA 17. DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE PZT AO LONGO DO TEMPO (DIAS) PARA AS AMOSTRAS DE PZT PURO, A-CPX, B-CPX E Γ -CPX EXPOSTAS À LUZ UV. O EIXO VERTICAL REPRESENTA O VALOR DE $\text{LOG}_{10}R(\%)$ (ADIMENSIONAL) E O EIXO HORIZONTAL O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO (EM DIAS).	61
FIGURA 18. MAPA DE ABSORÇÃO RELATIVO AO COMPRIMENTO DE ONDA (EIXO VERTICAL) <i>VERSUS</i> TEMPO DE CORRIDA OBTIDO DE UMA AMOSTRA DE PZT PURO APÓS 8 DIAS DE EXPOSIÇÃO. A INTENSIDADE DOS PICOS É DADA EM FUNÇÃO DA ESCALA DE CORES. AS IMPUREZAS IMP-1 E IMP-2 ESTÃO MARCADAS. ..	62
FIGURA 19. EXEMPLO DE COMPARAÇÃO ESPECTRAL (INTENSIDADE <i>VERSUS</i> COMPRIMENTO DE ONDA) EFETUADA EM DAD PARA IMP-1 (A) E IMP-2 (B), ENTRE SOLUÇÕES DE PZT PURO (AZUL) E B-CPX (VERDE) APÓS RESPECTIVAMENTE 8 E 12 DIAS DE EXPOSIÇÃO À LUZ VISÍVEL.	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESUMO DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS DA AVALIAÇÃO DE FILTROS.....	46
TABELA 2. RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PZT EM CADA CONDIÇÃO DE ROBUSTEZ TESTADA.....	48
TABELA 3. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTATCAMP EXCEL® PARA O ESTUDO DA ROBUSTEZ. .	48
TABELA 4. RESULTADOS DA RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO (N=2) PARA FOTODEGRADAÇÃO DE SOLUÇÕES CONTENDO PZT, A-CPX, B-CPX E Γ-CPX.....	60
TABELA 5. RESULTADOS DE K_{OBS} , R^2 , $T_{1/2}$ E PROTEÇÃO RELATIVA PARA AS AMOSTRAS DE PZT, A-CPX, B-CPX E Γ- CPX	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA ÁCIDA, ALCALINA E OXIDATIVA APLICADAS AO PZT.....	36
QUADRO 2. CONCENTRAÇÕES DOS NÍVEIS DA CURVA DA LINEARIDADE	37
QUADRO 3. PARÂMETROS TESTADOS NO TESTE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO	39
QUADRO 4. RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE.	42
QUADRO 5. RESULTADOS DA ANÁLISE DE PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O PZT.	43
QUADRO 6. RESUMO DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS DA EXATIDÃO.	45

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CICLODEXTRINAS E SEUS COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	15
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO	18
2.1. ESTEQUIOMETRIA DE COMPLEXAÇÃO E TIPOS DE COMPLEXOS	19
2.1.1. DIAGRAMAS DO TIPO A	21
2.1.2. DIAGRAMAS DO TIPO B	22
3. PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO	23
3.1. COPRECIPITAÇÃO	24
3.2. COEVAPORAÇÃO.....	24
3.3. NEUTRALIZAÇÃO.....	24
3.4. LIOFILIZAÇÃO	25
3.5. “SPRAY DRYING”	25
3.6. MALAXAGEM	25
3.7. MOAGEM	25
3.8. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	26
4. CONCLUSÕES	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
 CAPÍTULO 2: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO INDICADOR DE ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE PIZOTIFENO NA PRESENÇA DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	 31
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1. REAGENTES	34
2.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	35
2.3. PROGRAMAS DE CÁLCULO	35
2.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	36
2.4.1. SELETIVIDADE	36
2.4.2. DEGRADAÇÃO EM SOLUÇÃO	36

2.4.3. EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO VISÍVEL E ULTRAVIOLETA	36
2.4.4. LINEARIDADE	37
2.4.5. SENSIBILIDADE E ESTIMATIVA DOS LIMITES INFERIORES DE DETECÇÃO (LID) E QUANTIFICAÇÃO (LIQ)	38
2.4.6. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	38
2.4.7. EXATIDÃO	38
2.4.8. SELEÇÃO E SATURAÇÃO DE FILTROS	39
2.4.9. ROBUSTEZ	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA	40
3.2. SELETIVIDADE	40
3.3. LINEARIDADE	41
3.4. SENSIBILIDADE	43
3.5. ESTIMATIVA DOS LIMITES INFERIORES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	43
3.6. PRECISÃO	43
3.7. EXATIDÃO	44
3.8. VALIDAÇÃO DE FILTROS	46
3.9. ROBUSTEZ	48
4. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO COM CICLODEXTRINAS NA FOTODEGRADAÇÃO DO PIZOTIFENO EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	53
RESUMO	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1. REAGENTES	56
2.2. CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS DE QUANTIFICAÇÃO	56
2.3. OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO (CIs)	57
2.4. ENSAIO DE FOTOESTABILIDADE	57
2.5. ANÁLISE ESPECTRAL	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

CAPÍTULO 1:

Ciclodextrinas e seus complexos de inclusão

RESUMO

As ciclodextrinas são oligossacarídeos descobertos há mais de cem anos e utilizados para modificação de propriedades físico-químicas de moléculas, aplicadas especialmente para aumentar/modificar sua solubilidade através da formação de complexos de inclusão tipo hóspede-hospedeiro entre sua cavidade apolar e grupamentos afins das moléculas hóspedes. O sucesso na obtenção dos complexos de inclusão depende muito do método empregado e é necessário conhecer as opções disponíveis para selecionar aquela ofereça a melhor relação entre eficiência e rendimento. Dentre as técnicas utilizadas para a obtenção destes complexos as mais destacadas são a coprecipitação, coevaporação, neutralização, liofilização, *spray-drying*, malaxagem, moagem e fluidos supercríticos.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos inovadores tem se tornado especialmente desafiador para as indústrias farmacêuticas nos últimos anos, fato este comprovado pelo número cada vez menor de lançamentos de moléculas inteiramente novas. Dentro deste escopo, a modificação de moléculas existentes e já consolidadas na área farmacêutica, de modo a otimizar suas propriedades físico-químicas, torna-se uma opção atraente para compensar esta dificuldade (CAVALLA e MINHAS, 2010; CUATRECASAS, 2006; SANDNER e ZIEGELBAUER, 2008).

Há diversas alternativas para modificar as propriedades de fármacos, dentre elas a complexação com ciclodextrinas são particularmente interessantes (ABD-el-BARY et al., 1999, LI et al., 2002, UEKAMA, 2004, ZHOU et al., 2008). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glucopirranose unidas por ligações do tipo α -1,4 glicosídicas e sua estrutura básica é formada mais comumente por 6, 7 ou 8 unidades de glicose conforme apresentado na Figura 1 e recebem a denominação de α -, β - e γ -ciclodextrinas respectivamente.

A conformação espacial das ciclodextrinas assemelha-se à do toróide apresentado na Figura 2, com seus grupamentos apolares voltados para a parte interna e seus grupamentos polares voltados para a face externa do cilindro. Esta conformação possibilita que estes oligossacarídeos atuem como receptores de moléculas lipofílicas ou fármacos apolares de tamanho adequado. Os grupos polares das extremidades podem, por exemplo, conferir ao complexo proteção contra ataques químicos, térmicos e fotolíticos e incrementar sua hidrossolubilidade. (AULTON, 2005; SZEJTLI, 1988; del VALLE, 2004).

Figura 1: Representação estrutural das ciclodextrinas. Dependendo da quantidade glicoses (n) pode ter-se a α , β ou γ -ciclodextrina (adaptado de STELLA e HE, 2008)

Figura 2: Representação esquemática do formato cilíndrico de uma α -ciclodextrina
(Adaptado de CHALLA *et al.*, 2005)

De acordo com as propriedades da molécula hóspede (e.g. geometria, solubilidade, hidrofiliicidade/hidrofobicidade) a forma de preparo do complexo de inclusão (CI) pode desempenhar um papel fundamental na eficiência da complexação. No presente trabalho será apresentada uma revisão da literatura disponível sobre a formação e obtenção dos CI com ciclodextrinas.

2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO

A principal propriedade das ciclodextrinas é a sua capacidade de admitir espécies iônicas e moleculares em sua cavidade interna e com isto modificar propriedades físico-químicas e biológicas do fármaco original. Os compostos formados pela inclusão de moléculas na parte interna de uma ciclodextrina são chamados de complexos, ou compostos, de inclusão (SJETLI, 1988).

A inclusão de fármacos em ciclodextrinas é um processo termodinamicamente factível e estável, pois o processo se dá ao deslocar a água, polar, originalmente existente na cavidade apolar da ciclodextrina para incluir uma molécula de caráter apolar. Este tipo de reação envolve aumento da entropia do sistema e redução da energia total em função, basicamente, de quatro motivos (del VALLE, 2004):

- Deslocamento das moléculas polares de água da cavidade apolar da ciclodextrina;
- Aumento na quantidade de pontes de hidrogênio formadas pelas moléculas de água saídas da cavidade da ciclodextrina com as da solução;

- Redução das interações de repulsão entre o hóspede hidrofóbico (fármaco) e o ambiente aquoso;
- Aumento das interações hidrofóbicas na medida em que o hóspede é inserido na cavidade apolar da ciclodextrina;

Além da vantagem termodinâmica, é importante que seja avaliada a geometria do sistema e a polaridade da molécula hóspede para que a complexação possa ocorrer (SJETLI, 1988; VEIGA, PECORELLI E RIBEIRO 2006, del VALLE, 2004).

2.1. Estequiometria de complexação e tipos de complexos

A estequiometria da complexação pode ser representada genericamente pela Equação 1 e Equação 2, (del VALLE, 2004 e VEIGA, PECORELLI E RIBEIRO, 2006).

$$K_{C(m:n)} = \frac{[F_n CD_m]}{[F_{(solução)}]^m \times [CD]^n} = \frac{1}{K_{d(m:n)}} \quad \text{Equação 2}$$

Nestes modelos, “F_(ppt)” representa o fármaco no estado sólido suspenso no meio, “F_(solução)” representa o fármaco livre em solução, “CD” representa a ciclodextrina livre em solução, “FCD” o CI fármaco-ciclodextrina, “S₀” representa a solubilidade do fármaco livre no meio, “S_c” é a solubilidade do complexo, “K_{C(m:n)}” é a constante de estabilidade, “K_{d(m:n)}” é a constante de dissociação, “m” e “n” são as quantidades estequiométricas relativas de fármaco e ciclodextrina, respectivamente.

As constantes “K_c” e “K_d” são uma forma de medição da extensão das modificações físico-químicas ocorridas após a complexação da molécula hóspede com a ciclodextrina (del VALLE, 2004; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006). Quanto maior o valor da constante de associação entre o fármaco e a ciclodextrina, mais intensos são a complexação e os efeitos desta sobre as propriedades físico-químicas do produto final. Para cada candidato a “fármaco hóspede” um valor diferente de K_c pode ser obtido. Valores típicos desta constante oscilam entre 10 M⁻¹ e 1000 M⁻¹ (esta unidade é válida apenas quando a

De acordo com a estequiometria dos complexos formados, diferentes perfis de solubilidade de fases podem ser observados (CHALLA, 2005 e STELLA, 2004):

2.1.1. Diagramas do Tipo A

Caracterizado pela formação de complexos solúveis, nos quais a quantidade total dissolvida de fármaco é proporcionalmente maior a medida em que a ciclodextrina é adicionada. Este comportamento pode ser observado em três variações distintas: A_L , A_P e A_N , descritas a seguir.

- i. A_L : O incremento da solubilidade do fármaco com a adição da ciclodextrina é linear, e, usualmente, relacionam-se à formação de complexos com uma unidade de ciclodextrina (primeira ordem) e podem possuir uma ou mais moléculas de fármaco (primeira ordem ou superior com relação ao fármaco). Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente angular maior é a probabilidade da estequiometria do complexo ser de 1:1. Caso o coeficiente angular seja maior, provavelmente complexos de maior ordem com relação ao fármaco estão sendo formados. Por outro lado, coeficientes angulares menores que este valor podem indicar a formação de complexos de estequiometria 1:1, mas com eficiência menor que 100% (del VALLE, 2004; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).
- ii. A_P : O aumento da solubilidade do fármaco com concentrações maiores de ciclodextrina não ocorre de forma linear, mas um desvio positivo em relação ao tipo A_L . Este tipo de curva mostra a ocorrência da associação de mais de uma ciclodextrina com o fármaco (ordem maior com relação à ciclodextrina). É possível estimar a estequiometria desta associação por meio de um ajuste de curva sobre a porção não linear do gráfico.
- iii. A_N : Apresenta um desvio negativo em relação ao modelo A_L . Este tipo de curva é de difícil análise e pode significar uma associação do fármaco consigo mesmo em altas concentrações de ciclodextrina ou uma mudança na constante dielétrica do meio provocada pela adição da ciclodextrina.

2.1.2. Diagramas do Tipo B

Caracterizado pela desproporcionalidade da variação da solubilidade total do fármaco com o incremento da quantidade de ciclodextrina, demonstrando a formação de complexos com solubilidade limitada.

- i. B_S : Representado pelo segmento S_0 -A-B- B_S da Figura 3. Este fenômeno consiste num aumento inicialmente linear da solubilidade total do fármaco com a adição da ciclodextrina (S_0 -A) similar ao tipo A_L , até um ponto em que se estabelece um equilíbrio entre a adição de ciclodextrina e precipitação do CI provocando um platô (segmento A-B) até um ponto no qual há o total consumo do fármaco na solução e a concentração de fármaco no meio decresce até o valor da solubilidade do complexo, S_C (Segmento B- B_S). A estequiometria neste caso pode ser estimada a partir da sua porção linear inicial (similar à interpretação do modelo A_L), mas também pode ocorrer que o produto formado na porção final do diagrama de fases seja de ordem diferente do obtido na porção linear (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).
- ii. B_I : Representado pela curva B_I da Figura 3. Neste caso o complexo formado é muito pouco solúvel no meio e nem mesmo um leve incremento da solubilidade do fármaco é observado e tão logo a ciclodextrina é adicionada ocorre a precipitação deste complexo com a consequente solubilização da quantidade equivalente do fármaco suspenso no meio e a manutenção do valor da concentração total de fármaco dissolvido até o ponto em que todo o fármaco suspenso foi consumido pela complexação e é observada a redução gradual da concentração do fármaco solubilizado até o valor da solubilidade do complexo.

Além dos tipos descritos podem ocorrer ainda associações das ciclodextrinas entre si e formação de complexos por outras rotas que não a da inclusão na cavidade, conforme descrito em Loftsson, Másson e Brewster (2004).

Segundo a dedução feita por del Valle (2004) é possível estimar o valor da constante de associação fármaco-ciclodextrina para complexos de estequiometria 1:1 a partir da regressão linear (Equação 3) do diagrama de solubilidade de fases e comparando com a Equação 4 e obtendo, desta forma, o valor de K_C a partir do coeficiente angular da regressão conforme mostrado na Equação 5.

$$y = b + a \cdot x \quad \text{Equação 3}$$

$$S_{Total} = S_0 + \left(\frac{K_{C(1:1)} \cdot S_0}{K_{C(1:1)} \cdot S_0 + 1} \right) \cdot [CD_{Total}] \quad \text{Equação 4}$$

$$K_{C(1:1)} = \frac{a}{S_0 \cdot (1 - a)} \quad \text{Equação 5}$$

Nas expressões acima “ S_{Total} ” é a solubilidade total do fármaco na solução incluindo a porção livre (“ S_0 ”) e complexada com ciclodextrina, “ $K_{C(1:1)}$ ” é a constante de associação fármaco-ciclodextrina para o caso da estequiometria ser 1:1 e “ CD_{Total} ” é a concentração total de ciclodextrina adicionada ao meio.

Como para cada fármaco em análise podem ocorrer diferentes formas de complexação é possível que a estequiometria seja também diferente e há modelos de equações distintos para estimar as constantes de associação nestes casos (LOFTSSON et al., 2005, VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

Independentemente da forma como ocorre a complexação deve ser observado que o método de diagrama de fases não é capaz de afirmar exatamente qual a estequiometria do complexo obtido e nem o grupo funcional ou porção da molécula do fármaco que está sendo incluída na cavidade da ciclodextrina. Para estabelecer tal relação é necessário utilizar técnicas auxiliares como por exemplo RMN (AL OMARI et al., 2008; ASBAHR et al., 2009; FIGUEIRAS et al., 2007; VEIGA et al., 2001), espectrometria UV/Visível e de infravermelho (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006), difração de raios-X, termogravimetria (TG) e calorimetria de varredura diferencial (DSC).

3. PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

De acordo com o fármaco e o modo de preparo utilizados a complexação poderá originar produtos com diferentes propriedades físico-químicas (MURA et al., 1999) e, portanto, haverá um processo que oferecerá melhores rendimento e pureza em relação aos outros, devendo ser escolhido o que oferecer melhor balanço entre isso e a facilidade de transposição de escala laboratorial para industrial (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

3.1. Coprecipitação

Baseada no método da solubilidade de fases, esta técnica é mais utilizada quando são obtidos complexos do tipo B_s (de solubilidade limitada). São adicionadas a um meio aquoso quantidades suficientes de ciclodextrina e fármaco na mesma proporção encontrada na porção descendente da curva de solubilidade de fases, de modo que não haja fármaco livre para se solubilizar e que o complexo formado fique majoritariamente precipitado sem que o limite de solubilidade da ciclodextrina seja atingido, podendo o complexo ser removido por meio de filtração e secado posteriormente.

No caso de fármacos muito pouco solúveis em água pode ser preparada uma solução deste num solvente orgânico apropriado (miscível com água) e esta ser adicionada lentamente, sob agitação constante, a uma solução aquosa contendo a ciclodextrina de modo que o complexo também precipite-se. Deve-se tomar cuidado ao selecionar um solvente para que não ocorra competição com o fármaco pela cavidade da ciclodextrina.

3.2. Coevaporação

Nesta técnica é preparada uma solução aquosa de ciclodextrina e o fármaco é adicionado lentamente, sob agitação magnética, de modo que ao final ambos estejam em quantidades estequiométricas, e a agitação deve ser mantida por tempo adequado para garantir a completa solubilização dos materiais (em caso de precipitação a suspensão deve ser filtrada). A solução assim obtida deve ser então evaporada em evaporador rotativo, sob vácuo, até remover a maior parte da água. O resíduo semi-sólido obtido pode então ser seco em uma estufa.

3.3. Neutralização

Aproveita-se da presença de um grupo funcional ácido ou básico da molécula-hóspede para potencializar a complexação. Primeiramente o fármaco é completamente solubilizado como sal numa solução aquosa ácida ou básica de ciclodextrina. Esta solução é então neutralizada e o CI em estado sólido pode ser obtido através de filtração.

3.4. Liofilização

Da mesma forma que no processo de coevaporação esta técnica parte de uma solução aquosa de fármaco e ciclodextrina adicionados estequiometricamente. Esta solução é então liofilizada, sendo o complexo obtido lavado com éter dietílico e seco em estufa. O rendimento desta técnica é bastante elevado e é facilmente levado da escala piloto à industrial, mas não é facilmente detectável se o composto final formado é um complexo de inclusão verdadeiro, uma mistura física de ciclodextrina e fármaco ou uma combinação de ambos.

3.5. “Spray Drying”

Esta técnica parte também de uma solução aquosa contendo fármaco e ciclodextrina em proporções estequiométricas. Esta solução é pulverizada num ambiente com ar aquecido em contra corrente, o que provoca a evaporação imediata do solvente e resulta num produto sólido e amorfo, idêntico ao obtido na liofilização. Pode-se utilizar ainda um solvente orgânico (e.g. etanol) para auxiliar o processo de secagem. Este processo possui um rendimento bem inferior ao da liofilização e não deve ser aplicado a fármacos termolábeis.

3.6. Malaxagem

A complexação nesta técnica é feita através da adição do fármaco (puro ou em solução etanólica) em uma pasta aquosa de ciclodextrina. Esta mistura é homogeneizada por algumas horas e então lavada com um solvente adequado para remover o fármaco não complexado e, então, seca em estufa.

3.7. Moagem

Esta é a técnica mais simples para obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas e consiste na mistura intensa da ciclodextrina com o fármaco num moinho adequado (e.g. de esferas) e a ação mecânica deste provoca a inclusão da molécula-hóspede na cavidade da ciclodextrina. Apesar desta simplicidade o produto obtido é normalmente

instável e pode ser obtida apenas uma mistura física de fármaco com ciclodextrina, mas de difícil diferenciação pelo baixo índice de cristalinidade resultante da ação do moinho.

3.8. Fluidos supercríticos

Dentre as diversas aplicações dos fluidos supercríticos em tecnologia farmacêutica esta técnica é citada como uma opção interessante do ponto de vista da eficiência da complexação (THAKKAR et al., 2009; SEKHON, 2010 e HERRERO et al., 2010). Tanto a ciclodextrina quanto o fármaco são dispersos num fluido em condição supercrítica (e.g. dióxido de carbono), mantidos em contato por um período e então o fluido é removido através da simples despressurização do sistema resultando num produto completamente seco e livre de solventes, muito similar ao produto obtido através do processo de liofilização. Já foram descritos preparos de complexos de inclusão deste tipo com piroxicam e agentes antifúngicos como miconazol e itraconazol (AL-MARZOUQI et al., HASSAN et al., 2007; VAN HEES et al., 2002).

4. CONCLUSÕES

A seleção de um método de preparo para um complexo de inclusão com ciclodextrinas é uma tarefa árdua. Há a necessidade de conhecer muito bem o tipo de CI formado para que o processo mais adequado seja utilizado e a maior eficiência de complexação possível seja atingida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] ABD-EL-BARY, A.; GENEIDY, A.; OSMAN, A.E.M.; SHALABY, S.; MORSHAN, A. Solid state stability of ketoprofen in the presence of different excipients. Die Pharmazie. v.54, n.3, p.202-206, 1999.
- [2] AL OMARI, M.M.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D.; BADWAN, A.A. Factors Contributing to Solubility Synergism of Some Basic Drugs with β -Cyclodextrin in Ternary Molecular

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- Complexes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. v.54, p.159-164, 2006.
- [3] AL OMARI, M.M.; EL-BARGHOUTH, M.I.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D.; BADWAN, A.A. Comparative study of the inclusion complexation of pizotifen and ketotifen with native and modified cyclodextrins. Journal of Solution Chemistry. v.37, p.249-264, 2008.
- [4] AL-MARZOUQI, A.H.; ELWY, H.M.; SHEHADI, I.; ADEM, A. Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v.49, p.227-233, 2009.
- [5] ALVES-PRADO, H.F.; CARNEIRO, A.A.; PAVEZZI, F.C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; FRANCO, C.M.; DA SILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.146, p.3-13, 2008.
- [6] ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ªed. Porto Alegre: Artmed, 2007, 776p.
- [7] ASBAHR, A.C.C.; FRANCO, L.; BARISON, A.; SILVA, C.W.P.; FERRAZ, H.G.; RODRIGUES, L.N.C. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP β CD and polymers: Preparation and characterization. Bioorganic & Medicinal Chemistry. v.17, p.2718-2723, 2009.
- [8] AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 677p.
- [9] CAVALLA, D.; MINHAS, R. Does R&D Pay? Drug Discovery Today. v.15, p.230-234, 2010.
- [10] CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS Pharm. Sci. Tech. v.6, n.2, p.E329-E357, 2005.
- [11] CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; CORTI, G.; FURLANETTO, S.; MURA, P. Simultaneous effect of cyclodextrin complexation, pH, and hydrophilic polymers on naproxen solubilization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v.42, n.1, p.126-131, 2006.

- [12] CUATRECASAS, P. Drug discovery in jeopardy. The Journal of Clinical Investigation, v.116, n.11, p.2837-2842, 2006.
- [13] DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry. v.39, p.1033-1046, 2004.
- [14] FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.A.; RIBEIRO, L.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; VEIGA, F.J.B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. v.67, p.531-539, 2007.
- [15] HASSAN, H.A.; AL-MARZOUQI, A.H.; JOBE, B.; HAMZA, A.A.; RAMADAN, G.A. Enhancement of dissolution amount and *in vivo* bioavailability of intraconazole by complexation with β -cyclodextrin using supercritical carbon dioxide. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v.45, p.243-250, 2007.
- [16] HERRERO, M.; MENDIOLA, J.A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. Journal of Chromatography A. v.1217, p.2495-2511, 2010.
- [17] HIGUCHI, T.; CONNORS, A.K. Phase-solubility techniques, in: C.N. Reill (Ed.), Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, Wiley-Intersciences. New York. p. 117–212, 1965.
- [18] LI, J.; GUO, Y.; ZOGRAFI, G. The solid state stability of amorphous quinapril in the presence of β -cyclodextrins. Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 91, n. 1, p.229-243, 2002.
- [19] LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M.E. Self Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences. v.93, n.5, p.1091-1099, 2004.
- [20] LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. Expert Opinion in Drug Delivery. v.2, n.2, p.335-351, 2005.

- [21] LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics. v.329, n. 1-2, p.1-11, 2007.
- [22] MURA, P.; FAUCCI, M.T.; MANDERIOLI, A.; BRAMANTI, G. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins. International Journal of Pharmaceutics. v.193, n.1, p.85-95 1999.
- [23] REDENTI, E.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. Journal of Pharmaceutical Sciences. v.90, n.8, p.979-986, 2001.
- [24] SANDNER, P.; ZIEGELBAUER, K. Product-related research: how research can contribute to successful life-cycle management. Drug Discovery Today, v.13, p 457-463, 2008.
- [25] SEKHON, B.S. Supercritical Fluid Technology: An overview of Pharmaceutical Applications. International Journal of PharmTech Research. v.2, n.1, p.810-826, 2010.
- [26] SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. Biotechnology Advances. v.20, p.341-359, 2002.
- [27] STELLA, V.J.; HE, Q. Cyclodextrins. Toxicologic Pathology. v.36, n.1, p.30-42, 2008.
- [28] SZEJTLI, J. Cyclodextrin Technology. 1st ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1988, 464p.
- [29] SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chemical Reviews. v. 98, p.1743–1753, 1998.
- [30] SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure and Applied Chemistry. v.76, p.1825–1845, 2004.
- [31] THAKKAR, F.M.V.T.; SONI,T.G.; GOHEL, M.C.; GANNNDHI,T.R. Supercritical fluid technology: a promising approach to enhance the drug solubility. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. v.1, n.4, p.1-14, 2009.
- [32] UEKAMA, K. Design and Evaluation of Cyclodextrin-Based Drug Formulation. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. v.52, n.8, p.900-915, 2004.

- [33] VAN HEES, T.; BARILLARO, V.; PIEL, G.; BERTHOLET, P.; DE HASSONVILLE, S.H.; EVRARD, B.; DELATTRE, L. Application of supercritical Carbon Dioxide for the Preparation of Drug-Cyclodextrin Inclusion Compounds. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. v.44, p.271-274, 2002.
- [34] VEIGA, F.J.; FERNANDES, C.M.; CARVALHO, R.A.; GERALDES, C.F. Molecular Modelling and ¹H-NMR: Ultimate Tools for the Investigation of Tolbutamide : β -Cyclodextrin and Tolbutamide : Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complexes. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. v.49, n.10, p.1251-1256, 2001.
- [35] VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, 1ª Ed. Minerva Coimbra, Coimbra, 2006, 228p.
- [36] ZHOU, S.; WANG, L.; ZHANG, A.; LIN, K.; LIU, W. Preparation, stabilization and bioefficacy of β -cyclodextrin inclusion compounds of chloroamidophos. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.56, n.8, p.2708-2713, 2008.

CAPÍTULO 2:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
CROMATOGRÁFICO INDICADOR DE ESTABILIDADE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE PIZOTIFENO NA PRESENÇA
DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

RESUMO

Neste trabalho é apresentada a validação de um método analítico cromatográfico indicador de estabilidade para malato de pizotifeno (PZT) quanto à sua seletividade, linearidade, precisão intermediária, exatidão, estimativas de limites inferiores de quantificação e detecção, robustez e saturação dos filtros. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Wakosil II 5C18 RS, 250mm x 4,6mm (5 μ m). A fase móvel (FM) consistiu numa mistura de solução aquosa de (NaH₂PO₄ + Pic B8) 2 mmol/l:acetonitrila:triethylamina (600:400:2, v/v) com pH aparente de 3,00 $\pm$ 0,05. A vazão de trabalho foi de 1,5 ml/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. O método avaliado mostrou-se capaz de separar o PZT de seus principais produtos de degradação, preciso, exato, satisfatoriamente linear ($r^2 > 0,999$, intercepto-y próximo de zero), robusto quanto ao pH, composição e vazão da FM e a condição de filtração ideal foi através de filtros de PVDF hidrofílico.

1. INTRODUÇÃO

O pizotifeno (PZT, $C_{19}H_{21}NS$) é um fármaco tricíclico derivado do benzocicloheptatiofeno ligado à metilpiperidina e um agente anti-histamínico sedativo com propriedades anti-serotoninérgicas fortes e antimuscarínicas fracas. O PZT (Figura 4), normalmente preparado como malato ($C_{19}H_{21}NS.C_4H_6O_5$), é usado no tratamento de enxaqueca e na prevenção de ataques de cefaléia em salvas (MARTINDALE, 2009; MERCK, 2006).

Figura 4. Estrutura química do PZT.

Este fármaco está descrito na farmacopéia britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009) que indica a titulação potenciométrica para quantificação enquanto as substâncias relacionadas são verificadas através de cromatografia em camada delgada. Na literatura também foram propostos métodos de absorção atômica e colorimetria (EL-KOUSY e BEBAWY, 1999).

Uma técnica adequada para quantificar fármacos nesta condição é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Abounassif, El-Obeid e Gadkariem (2005) descreveram um método de CLAE para quantificação de PZT na presença de seus compostos de degradação por exposição à luz, mas seu estudo não contemplou a presença de contaminantes de outras fontes de degradação como a hidrolítica e oxidativa.

Por outro lado, a validação de um método analítico na área farmacêutica é a garantia de que ele é adequado para seu uso pretendido, ou seja, que será capaz de atestar uma

determinada característica de um material, seja sua identidade, potência, teor ou performance (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 1996a).

Atualmente diversos compêndios e órgãos oficiais disponibilizam resoluções sobre a validação analítica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 1996a; JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2006; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2009), entretanto estas referências dedicam-se às definições dos parâmetros que compõem uma validação e muito pouco é definido sobre os parâmetros objetivos de sua avaliação. Um exemplo desta deficiência é utilização apenas do coeficiente quadrático de correlação linear como único indicativo de linearidade (HÁJKOVÁ *et al.*, 2007; MOSTAFAVI *et al.*, 2009; SEMREEN e ABOUL-ENEIN, 2010) ou maior enfoque num determinado parâmetro de validação sem utilizar o mesmo rigor nos demais (HÁJKOVÁ *et al.*, 2007). Ao detectar esta deficiência diversos autores têm publicado revisões sobre como avaliar de formas diferentes e estatisticamente significativas cada item de uma validação analítica (ARAUJO, 2009; BLIESNER, 2006; BOUABIDI *et al.*, 2010; GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007) incluindo uma série de artigos de Hubert *et al.* (2004, 2007a, 2007b, 2008) comentando as sugestões da “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques”.

Então, o objetivo do presente trabalho é a validação da metodologia de quantificação de PZT em presença de seus produtos de degradação através de CLAE segundo parâmetros de seletividade, linearidade, sensibilidade, estimativa dos limites inferiores de quantificação e detecção, precisão intermediária, exatidão, robustez e validação de filtros de acordo com preconizado no guia Q2(R1) do ICH.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os reagentes acetonitrila grau cromatográfico, ácido clorídrico PA, ácido sulfúrico PA, o fosfato monobásico de sódio PA, o hidróxido de sódio PA foram da fabricados por Merck® (Darmstadt, Alemanha), o ácido ortofosfórico PA, o octanossulfonato de sódio grau cromatográfico e o permanganato de potássio grau PA foram fabricados por Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos) e a água ultrapura preparada no laboratório por sistema Milli-Q

da Millipore® (Bedford, Estados Unidos). Estes reagentes, o PZT e a substância de referência utilizados no presente trabalho foram gentilmente cedidos por Medley Indústria Farmacêutica Ltda (Campinas, Brasil).

2.2. Condições Cromatográficas

O cromatógrafo utilizado foi um Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemanha) modelo LaChrom ELITE, com bomba quaternária L2130 com sistema desgaseificador, injetor automático L2200 com sistema de controle de temperatura das amostras, forno para coluna L2300 e detector de arranjo de diodos (DAD) L2455, controlados pelo software EZChrom ELITE (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

Foi utilizada uma coluna cromatográfica Wakosil II 5C18 RS, 250mm x 4,6mm com tamanho de partícula igual a 5µm, marca SGE (Melbourne, Austrália). A fase móvel utilizada foi preparada pela mistura de uma solução salina de fosfato de sódio monobásico e octanossulfonato de sódio (ambos a 2 mmol/l) com acetonitrila e trietilamina na proporção 600:400:2 (v/v) e o pH aparente da mistura foi acertado para 3,00±0,05 com ácido ortofosfórico concentrado. A vazão de trabalho utilizada foi de 1,5 ml/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. Para quantificar o PZT foram feitas medidas em UV no comprimento de onda igual a 230 nm, mas para as análises de pureza cromatográfica um intervalo variável de 200 nm até 500 nm foi utilizado. O volume de injeção utilizado foi de 20µl.

2.3. Programas de cálculo

Os cálculos de linearidade, precisão, exatidão, estimativa de limite inferior de quantificação e sensibilidade foram feitos pelo programa Validation Manager® versão 2.20E (VWR INTERNATIONAL SAS, Périgueux, França, com brochura disponível gratuitamente em <http://ie.vwr-cmd.com/ex/downloads/brochures/vwr/vm_software_en.pdf>). Os cálculos da robustez foram efetuados através do suplemento EstatCamp Excel (Disponível gratuitamente para download em www.estatcamp.com.br) desenvolvido para Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, Estados Unidos).

2.4. Validação do método

2.4.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada como a sua capacidade de separar picos de produtos de degradação forçada e manter o pico do PZT cromatograficamente puro. As condições de degradação utilizadas são descritas a seguir.

2.4.2. Degradação em solução

Foi pesado cerca de 50 mg de PZT para um tubo de centrífuga de vidro de 50 ml, adicionou-se 20,0 ml de água ultrapura e 10,0 ml do solvente definido no Quadro 1. O tubo foi agitado até total solubilização do ativo com o auxílio de ultra-som, e deixado em agitação por até 72 h em mesa agitadora pendular à temperatura ambiente.

Quadro 1. Condições de degradação hidrolítica ácida, alcalina e oxidativa aplicadas ao PZT.

#	Solvente	Contra-solvente		Tempo de Agitação	Temperatura [°C]
		Descrição	Volume		
1	Água Ultrapura	-	-	72 h	25
2a	HCl 0,1 M	NaOH 0,1 M	10,0 ml	72 h	25
2b	HCl 1,0 M	NaOH 1,0 M	10,0 ml	24 h, 48 h e 72 h	25 e 50
3a	H ₂ SO ₄ 0,1 M	NaOH 0,1 M	20,0 ml	72 h	25
3b	H ₂ SO ₄ 1,0 M	NaOH 1,0 M	20,0 ml	72 h	25
4a	NaOH 0,1 M	HCl 0,1 M	10,0 ml	72 h	25
4b	NaOH 1,0 M	HCl 1,0 M	10,0 ml	24 h, 48 h e 72 h	25 e 50
5	H ₂ O ₂ 3%	-	-	24 h	25
6	KMnO ₄ 0,5 M	-	-	24	25

2.4.3. Exposição à radiação visível e ultravioleta

A degradação do fármaco pela luz foi realizada em câmara de fotoestabilidade marca Weiss Technik® (Reiskirchen, Alemanha) modelo Pharma 500L e as amostras foram expostas a condição de luz branca (até $1,2 \times 10^6$ lux.h.m⁻²) e logo depois luz ultravioleta (até 200 W.h.m⁻²) segundo o guia do Q1B do ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 1996b). Durante todo o ensaio a temperatura da câmara foi mantida a

25°C e com umidade relativa de 40%. Tanto para a solução, quanto para a amostra sólida, foram preparados controles protegidos da luz.

Para a amostra sólida uma quantidade suficiente de PZT foi transferida para um pesa filtro de modo a formar uma camada de não mais de 3 mm de espessura uniformemente distribuída e exposta à ação da luz. Após o tempo de exposição, foi preparada uma solução aquosa a 15 µg/ml de PZT. A solução foi filtrada através de filtro Millex® de PVDF hidrofílico de 0,45 µm, desprezando os primeiros 5 ml, diretamente para um frasco âmbar de injeção.

Para a amostra líquida foi preparada uma solução de PZT a 15 µg/ml, esta solução foi filtrada através de filtro Millex® de 0,45 µm diretamente para um frasco de injeção transparente e fechado com tampa e septo. Este frasco foi então exposto à câmara de fotoestabilidade.

2.4.4. Linearidade

Utilizando padrão primário de PZT foram preparadas três soluções estoque contendo 283,8 µg/ml, 308,5 µg/ml e 287,4 µg/ml de fármaco, numeradas respectivamente como soluções 1, 2 e 3 e então diluída para um dos níveis da linearidade (Quadro 2) . Cada nível foi então filtrado através de filtro tipo Millex® de PVDF hidrofílico de 0,45 µm, desprezando os primeiros 4 ml, diretamente para o frasco de injeção. Cada amostra foi injetada quatro vezes.

Quadro 2. Concentrações dos níveis da curva da linearidade

Nível	Nº da Solução Estoque	Volume Transferido (ml)	Balão (ml)	Concentração (µg/ml)
L1	2	0,50	50	3,09
L2	3	1,00	50	5,75
L3	1	1,50	50	8,52
L4	2	2,00	50	12,4
L5	2	2,00	25	24,7
L6	1	5,00	50	28,4

A avaliação da linearidade foi feita pelo software Validation Manager® através dos parâmetros de coeficiente quadrático de correlação linear, significância do coeficiente

angular (Teste de variância de Fisher), intercepto-Y (Teste t de Student), e desajuste da curva de segunda ordem (Teste de Mandel).

2.4.5. Sensibilidade e Estimativa dos Limites Inferiores de Detecção (LID) e Quantificação (LIQ)

O software Validation Manager® estimou os valores de sensibilidade e limites inferiores de detecção e quantificação a partir da curva da linearidade.

2.4.6. Precisão Intermediária

As amostras foram preparadas em 4 níveis de concentração (de 12 µg/ml até cerca de 24 µg/ml de PZT, com cada nível feito em duplicata e cada replicata injetada 3 vezes. O ensaio foi repetido em dois dias diferentes utilizando vidrarias e diluente diferentes. Como os dados de concentração e resposta foram obtidos em diferentes níveis de trabalho, os conjuntos foram normalizados através de uma transformação de variáveis para tratar os valores na mesma escala e efetuar corretamente as comparações.

Os resultados foram avaliados em dois níveis: no primeiro foi realizada uma seleção de dados e grupos no qual as injeções em foram analisadas em busca de “outliers” (valores aberrantes) através do teste de Dixon e o valor aberrante do grupo, se existente, foi isolado antes do prosseguimento dos cálculos para o próximo nível. Em seguida as variâncias de cada grupo foram analisadas em busca de grupos aberrantes pelo teste de Cochran e estes, caso existentes, foram isolados antes do prosseguimento dos cálculos ao próximo nível. O segundo nível foi o de comparação de desvios, ou precisão intermediária propriamente dita, calculada a partir da combinação das variâncias dos dados (intra-grupos) e entre os grupos (inter-grupos) aprovados no teste de Cochran para estimar um coeficiente de variação para o estudo de precisão.

Após a seleção dos dados segundo os níveis descritos foi estimado então o coeficiente de variação do conjunto.

2.4.7. Exatidão

As amostras utilizadas no teste de Exatidão foram as mesmas preparadas para o ensaio de Precisão. Os dados dos grupos de mesmo nível dos dois dias de teste foram combinados e

foi feita uma comparação entre as concentrações teórica e calculada a partir da curva de linearidade pelos parâmetros coeficiente quadrático de correlação linear, adequabilidade do coeficiente angular (Proximidade com o valor 1 segundo teste t de Student), intercepto-Y (Próximo de zero segundo teste t de student), desajuste da homogeneidade de erros (Teste F de Fisher) e o valor da recuperação média e do coeficiente de variação.

2.4.8. Seleção e Saturação de Filtros

Foram preparadas amostras em dois níveis de concentração (cerca de 2 µg/ml e 20 µg/ml de PZT) e cada solução foi testada com dois filtros de seringa de 0,45 µm com 33 mm e 13 mm de diâmetro externo e corpos de polipropileno e polietileno respectivamente e em cada filtro foram feitos testes com três volumes de descarte: 0 ml, 2 ml e 4 ml. Adicionalmente um filtro de cânula de 10 µm de polietileno foi testado para um volume de coleta de 5 ml.

2.4.9. Robustez

Alguns parâmetros da análise cromatográfica foram modificados, conforme apresentado no Quadro 3 e sua influência nos resultados da injeção de um mesmo padrão e amostras a cerca de 20 µg/ml de PZT foi medida para estimar a significância de cada modificação, se existente, sobre os resultados das injeções através da análise de uma ANOVA de efeitos aleatórios, um teste de variâncias e uma análise de efeitos principais para cada tipo de modificação testada.

Quadro 3. Parâmetros testados no teste de robustez do método analítico

CONDIÇÃO CROMATOGRÁFICA	VALOR		
	BAIXO (-)	ORIGINAL	ALTO (+)
Vazão	1,25 ml/min	1,5 ml/min	1,75 ml/min
Temperatura	25°C	30°C	35°C
Composição (Solução salina : Acetonitrila)	65 : 35	60 : 40	55 : 45

O padrão foi preparado com 22,4 µg/ml e as amostras 1, 2 e 3 com 20,0 µg/ml, 19,9 µg/ml e 20,2 µg/ml de PZT respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento da Metodologia

Na condição analítica utilizada o PZT eluiu entre 6,5 e 7,2 minutos, com número de pratos mínimo de 10.000, assimetria máxima de 1,50 e uma resolução de pelo menos 3,5 em relação ao pico do cloridrato de amitriptilina. Um cromatograma de exemplo dessa condição segue na Figura 5.

Figura 5. Cromatograma da condição analítica selecionada de uma amostra contendo PZT e amitriptilina (1º e 2º picos respectivamente). O tempo de retenção está marcado em minutos.

3.2. Seletividade

O fármaco mostrou-se bastante resistente a ataques ácidos e alcalinos, bem como à fotólise quando em estado sólido (degradação <2%). Por outro lado foi susceptível a degradação oxidativa (permanganato de potássio e peróxido de hidrogênio) e a ação da luz quando em solução. Em nenhuma das amostras de degradação houve qualquer interferência perceptível de algum produto de degradação que coeluisse com o PZT, visto que a pureza de pico permaneceu igual a 1,000 em todas as injeções. Cromatogramas de uma amostra de PZT puro e fotodegradado são apresentados na Figura 6.

Figura 6. Cromatogramas de amostras de PZT puro (linha superior, azul) e fotodegradado (linha inferior, verde). Os picos relativos aos produtos de degradação do PZT estão completamente resolvidos do pico principal, com uma pureza espectral de 1,000.

3.3. Linearidade

A curva de linearidade (Figura 7) e o gráfico dos resíduos (Figura 8) foram gerados pelo software Validation Manager® e os resultados estatísticos são apresentados no Quadro 4.

Figura 7. Curva de concentração (em $\mu\text{g/ml}$) versus área do pico de PZT. O intervalo da curva está representado pelas curvas tracejadas.

Figura 8. Gráfico dos resíduos da regressão linear. Concentração (em $\mu\text{g/ml}$ de PZT) versus Área do pico do PZT. O intervalo dos resíduos está representado pelas curvas tracejadas.

Quadro 4. Resultados estatísticos da avaliação da linearidade.

VARIÂNCIA DA LINEARIDADE	
Nível de confiança	95
t de Student	1,717
Intercepto-Y	-3,017e+003
Coeficiente angular	1,106e+005
Coeficiente de determinação r^2	0,99959
ANÁLISE DO COEFICIENTE ANGULAR	
Nível de confiança	95
Graus de liberdade (1,2)	1, 22
F tabelado	4,300
F calculado	5,365e+004
Teste de Fisher:	Satisfatório
ANÁLISE DO MODELO LINEAR (MANDEL)	
Nível de confiança	95
Graus de liberdade (1,2)	1, 21
F tabelado	4,320
F calculado	2,349
Teste de Fisher:	Satisfatório
ANÁLISE DO Y-INTERCEPTO	
Nível de confiança (1-alpha/2)	95
Graus de liberdade	22
t tabelado	1,717
t calculado	0,377
Compatibilidade com 0:	Satisfatório

Segundo os parâmetros propostos o método foi considerado satisfatoriamente linear.

3.4. Sensibilidade

Os dados referentes ao estudo da linearidade foram usados para determinar o erro devido à regressão e com isso estimar o valor da sensibilidade 0,39 µg/ml, que representa a variação mínima na concentração do fármaco que é capaz de provocar um incremento significativo na área do pico do cromatograma.

3.5. Estimativa dos Limites Inferiores de Detecção e Quantificação

A partir dos resultados da linearidade (Quadro 4) o software foi capaz de estimar a relação sinal/ruído do método analítico. A partir desta, os valores dos limites inferiores ótimos de quantificação e detecção como 2,01 µg/ml e 0,66 µg/ml respectivamente.

3.6. Precisão

Nos dados obtidos para cálculo da precisão não houve nenhum valor individual ou grupo de valores suspeitos ou aberrantes. Os resultados dos cálculos da precisão são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5. Resultados da análise de precisão do método analítico para o PZT.

Número total de valores usados para os cálculos	48
Nível de confiança (1- α /2)	97,50
Graus de liberdade	47
t (tabelado)	2,00
Valor médio	2049159
Intervalo de variação	8223
Intervalo de variação (%)	0,40
Número de grupos	8
Variância de Precisão Intermediária S_R^2	8,114e+008
Coefficiente de variação de Precisão Intermediária	1,39

Neste caso, como a análise foi feita com transformação de variáveis a variância intergrupos é reduzida a zero e o coeficiente da repetibilidade fica igual ao da precisão intermediária.

3.7. Exatidão

Os resultados dos grupos utilizados no teste de precisão foram reunidos e as concentrações das respectivas amostras foram calculadas a partir da curva da linearidade. Para normalizar as variâncias observadas pelos diferentes preparos as concentrações teóricas e as áreas sofreram uma transformação de variáveis em cada nível a fim de facilitar a visualização dos resultados graficamente. Sobre estes dados foi feita uma regressão linear e as curvas de concentração teórica versus calculada e dos residuais são mostradas na Figura 9 e na Figura 10, respectivamente. Os resultados para os testes estatísticos são apresentados no Quadro 6.

Figura 9. Gráfico das concentrações calculadas a partir da curva de linearidade (eixo y) versus a concentração teórica das amostras utilizadas no ensaio da exatidão (eixo x) com seu respectivo intervalo (linhas tracejadas). Os valores são dados em $\mu\text{g/ml}$.

Apesar do valor 100% não estar incluído no intervalo de variação da recuperação média a distância é suficientemente pequena para ser desprezada ($<0,6\%$). Todos os demais parâmetros foram considerados satisfatórios e, portanto, o método pode ser considerado suficientemente exato.

Figura 10. Gráfico dos resíduos das concentrações calculadas em relação às concentrações teóricas com seu respectivo intervalo (linhas tracejadas). Os valores são dados em $\mu\text{g/ml}$.

Quadro 6. Resumo dos resultados dos parâmetros da exatidão (continua).

PARÂMETROS DA EXATIDÃO	
Nível de confiança	99,50
t de Student	1,671
Intercepto-Y	2,374e-002
- Variância	1,999e-002
Coefficiente angular	1,0043e+000
- Variância	5,51e-005
Coefficiente de determinação r^2	0,9975
ANÁLISE DO COEFICIENTE ANGULAR	
Graus de liberdade (1,2)	1, 46
F calculado	18289,8
Teste de Fisher:	Satisfatório
DESAJUSTE DA HOMOGENEIDADE DOS ERROS	
Graus de liberdade (1,2)	2, 44
F calculado	0,040
Teste de Fisher:	Satisfatório
ANÁLISE DO COEFICIENTE ANGULAR	
Coefficiente angular	1,00426e+000
Graus de liberdade	46
t calculado	0,574
Compatibilidade com 1	Satisfatório
ANÁLISE DO Y-INTERCEPTO	
Intercepto-Y	2,37399e-002
Nível de confiança (1- α /2)	95
t calculado	0,168
Compatibilidade com 0	Satisfatório

Quadro 6. Resumo dos resultados dos parâmetros da exatidão (conclusão).

RECUPERAÇÃO: ANÁLISE DA VARIÂNCIA	
Variância total	1,52916e+000
F calculado	0,069
Representatividade dos dados	Satisfatória
RECUPERAÇÃO MÉDIA	
Graus de liberdade	47
Recuperação média (%)	100,57
Variação (+-)	0,47

Da mesma forma, é possível obter neste parâmetro uma estimativa das variâncias inter e intra-grupos que foram originalmente distorcidas pela transformação de variáveis no item de precisão. Os valores mostrados aqui mostram que a variância intergrupos é muito menor que a variância intragrupos, o que corrobora a hipótese de que a estimativa da precisão do método, neste caso, é mais explicada pela diferença entre pesagens distintas do que pelo nível de cada pesagem.

3.8. Validação de Filtros

Os resultados dos testes com filtros são apresentados na Tabela 1 e demonstrados na Figura 11 e Figura 13 para filtros tipo Millex® com soluções de 20 µg/ml, 2 µg/ml respectivamente e na Figura 12 para o filtro de cânula.

Tabela 1. Resumo dos resultados dos parâmetros da avaliação de Filtros. DP significa Desvio Padrão.

Condição	Volume de Descarte	Recuperação [%]	DP [%]
Millex 0,45 µm – 33 mm o.d. ¹ – PP ² – 20 µg/ml	0 ml	85,7%	0,13%
	2 ml	99,1%	0,11%
	4 ml	100,2%	0,16%
Millex 0,45 µm – 33 mm o.d. - PP - 2 µg/ml	0 ml	14,8%	0,28%
	2 ml	92,6%	0,28%
	4 ml	101,9%	0,28%
Millex 0,45 µm – 13 mm o.d. – PE ³ - 20 µg/ml	0 ml	98,3%	0,43%
	2 ml	99,6%	0,29%
	4 ml	99,8%	0,33%
Millex 0,45 µm – 13 mm o.d. - PE - 2 µg/ml	0 ml	97,7%	0,75%
	2 ml	99,5%	0,28%
	4 ml	100,6%	0,28%
Filtro de Cânula 10 µm - 20 µg/ml	5,0ml de Coleta	96,4%	0,28%
Filtro de Cânula 10 µm - 2 µg/ml	5,0 ml de Coleta	51,0%	0,28%

¹ diâmetro externo do filtro.

² corpo do filtro em polipropileno.

³ corpo do filtro em polietileno.

Figura 11. Recuperação de solução de PZT 20 µg/ml de acordo com o tipo de filtro Millex e volume de saturação. (as barras de erro representam um desvio padrão acima e abaixo do valor encontrado, n=3). Medidas feitas em relação à amostra não filtrada.

Figura 12. Recuperação de solução de PZT 20 µg/ml e 2 µg/ml através do filtro de cânula de 10 µm (as barras de erro representam um desvio padrão acima e abaixo do valor encontrado, n=3). Medidas feitas em relação à amostra não filtrada.

Figura 13. Recuperação de solução de PZT 2 µg/ml de acordo com o tipo de filtro e volume de saturação. (as barras de erro representam um desvio padrão acima e abaixo do valor encontrado, n=3). Medidas feitas em relação à amostra não filtrada.

Foi possível observar que o filtro de 33 mm de diâmetro externo requer um volume maior de saturação (2,0 ml para a solução a 20 µg/ml e 4,0 ml para a solução a 2 µg/ml) do que o de 13 mm (2,0 ml para as duas soluções). O filtro de cânula mostrou-se inadequado para quaisquer das soluções testadas, com uma retenção de cerca de 3% de fármaco na solução a 20 µg/ml e de 50% da solução a 2 µg/ml.

Quaisquer dos filtros tipo Millex® testados podem ser utilizados para a análise, porém, deve ser utilizado um volume mínimo de descarte de 2 ml no caso do filtro de 13 mm de

diâmetro externo e de 4 ml no caso do filtro de 33 mm. O material do corpo não apresentou nenhuma interferência significativa nos cromatogramas registrados.

3.9. Robustez

Os resultados das recuperações das amostras em relação ao padrão em cada condição testada são apresentados na Tabela 2 e os resultados da análise feita com o ESTATCAMP Excel® são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Recuperação das amostras de PZT em cada condição de robustez testada. Valores de recuperação dados em [%]

#	Injeção	ORIGINAL	1,75 ml/min	1,25 ml/min	25°C	35°C	FM Forte	FM Fraca
1	1	99,4%	99,2%	99,2%	99,3%	99,2%	99,6%	99,3%
	2	99,0%	99,1%	99,0%	99,1%	99,4%	99,5%	99,2%
2	1	94,7%	94,1%	93,3%	92,7%	92,4%	92,2%	91,2%
	2	94,6%	93,9%	92,4%	91,7%	91,7%	91,9%	90,7%
3	1	100,2%	99,8%	100,2%	99,9%	100,0%	98,7%	100,0%
	2	99,9%	99,7%	100,2%	99,6%	100,0%	100,3%	100,0%
MÉDIA:		98,0%	97,6%	97,4%	97,1%	97,1%	97,0%	96,7%
DP:		2,6%	2,8%	3,6%	3,8%	3,9%	3,9%	4,5%

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos através do ESTATCAMP Excel® para o estudo da robustez.

CONDIÇÃO TESTADA	ANOVA COM EFEITOS ALEATÓRIOS		TESTES DE VARIÂNCIA	
	DESVIO PADRÃO	p-VALOR	GL ¹	p-VALOR
VAZÃO	6,55904E-07	0,9999	2	0,91197
TEMPERATURA	7,60132E-07	0,99996	2	0,85646
COMPOSIÇÃO	7,60132E-07	0,99996	2	0,85646

* Graus de Liberdade

Os p-valores encontrados na ANOVA com efeitos aleatórios (todos > 0,05) demonstram que não há diferença significativa entre os níveis testados em cada condição e que os valores

de desvio padrão obtidos foram devidos a erros aleatórios associados ao método e não à variação dos níveis. Da mesma forma os resultados de p-valor para os testes de variância demonstram que as variâncias das recuperações de cada nível em cada condição testada são coerentes e não apresentam oscilação significativa entre os níveis.

De acordo com os resultados obtidos, o método pode ser considerado robusto quanto à recuperação do fármaco quando submetido a pequenas variações de composição, vazão e temperatura da fase móvel de modo que estas condições podem ser modificadas para ajustar os parâmetros cromatográficos do pico do PZT sem prejuízo para a capacidade do método.

4. CONCLUSÕES

De acordo com a avaliação estatística efetuada neste estudo o método proposto para quantificação de PZT em presença de seus principais produtos de degradação pode ser considerado validado quanto à sua seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, saturação de filtros e seus limites inferiores de quantificação e detecção e sensibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[†]

- [1] ABOUNASSIF, M.A.; EI-OBEID, H.A.; GADKARIEM, E.A. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.36, p.1011-1018, 2005.
- [2] ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.877, n.23, p.2224-2234, 2009.
- [3] BLIESNER, D.M. Validating chromatographic methods: a practical guide. Hoboken: John Wiley, 2006. 304p.
- [4] BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENS, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUZE, A.; BOULANGER,

[†] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- B.; HUBERT, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. Journal of Chromatography, A, v.1217, n.19, p.3180-3192, 2010.
- [5] BRASIL. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária torna público o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, n.104, 2 jun. 2003. Seção 1, p.56.
- [6] BRITISH Pharmacopoeia 2009. London: Stationary Office, 2009. v.1, p.1650-1651.
- [7] EL-KOUSY, N.; BEBAWY, L.I. Determination of some antihistaminic drugs by atomic absorption spectrometry and colorimetric methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.20, p.971-679, 1999.
- [8] GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A. A practical guide to analytical method validation, including measurement of uncertainty and accuracy profiles. TrAC, Trends in Analytical Chemistry, v.26, n.3, p.227-238, 2007.
- [9] HÁJKOVÁ, R.; SKLENÁŘOVÁ, H.; MATYSOVÁ, L.; ŠVECOVÁ, P.; SOLICH, P. Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation. Talanta, v.73, p.483-489, 2007.
- [10] HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; NIVET, C.; VALAT, L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures – A SFSTP proposal – Part I. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.36, p.279-586, 2004.
- [11] HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures – A SFSTP proposal – Part II. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.45, p.70-81, 2007a.

- [12] HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures – A SFSTP proposal – Part III. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.45, p.82-96, 2007b.
- [13] HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures – A SFSTP proposal – Part IV: examples of application. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.48, p.760-771, 2008.
- [14] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Guideline to Industry Q2(R1): validation of analytical procedures: text and methodology. 1996a. 17p. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2010.
- [15] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, Guideline to Industry Q1B: stability testing: photostability testing of new drug substances and products. 1996. 12p. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA412.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2010.
- [16] JAPANESE Pharmacopoeia. 15.ed. Tokyo: Pharmaceutical and Food Safety Bureau, 2006. p. 1760.
- [17] MARTINDALE: The complete drug reference. Disponível em: <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/ms-14855-k.htm>. Acesso em: 24 nov. 2009.
- [18] MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p. 1347.
- [19] MOSTAFAVI, A.; ABEDI, G.; JAMSHIDI, A.; AFZALI, D.; TALEBI, M. Development and validation of an HPLC method for the determination of buprenorphine hydrochloride, naloxone hydrochloride and noroxymorphone in a tablet formulation. Talanta, v.77, p.1415-1419, 2009.

- [20] SEMREEN, M.H.; ABOUL-ENEIN, H.Y. LC-UV method development and validation for the non steroidal anti-inflammatory agent tenoxicam. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.33, p.720-729, 2010.
- [21] UNITED States Pharmacopoeia: USP 32: The National Formulary: NF 27. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009. v.1, p.733.
- [22] VWR INTERNATIONAL SAS. Validation Manager 3.0. Disponível em: http://ie.vwr-cmd.com/ex/downloads/brochures/vwr/vm_software_en.pdf. Acesso em: 07 out. 2010.

CAPÍTULO 3:
INFLUÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO COM
CICLODEXTRINAS NA FOTODEGRADAÇÃO DO
PIZOTIFENO EM SOLUÇÃO AQUOSA

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da complexação com α -, β - e γ -ciclodextrinas sobre a fotoestabilidade do pizotifeno em solução aquosa. Foram preparadas soluções dos complexos e do fármaco puro que foram, então, expostos em câmara de fotoestabilidade à radiação visível e UV por doze dias em frascos de vidro lacrados. A quantificação das amostras de cada período foi feita através de metodologia analítica indicadora de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência. Os complexos de inclusão conferiram ao fármaco uma velocidade de degradação no mínimo 20% menor em relação ao PZT puro e uma proteção relativa de até 1,61. A fotoproteção foi mais intensa para a solução contendo o complexo formado com β -ciclodextrina.

1. INTRODUÇÃO

O pizotifeno (PZT, $C_{19}H_{21}NS$) é um fármaco tricíclico derivado do benzocicloheptatiofeno ligado à metilpiperidina (KOROKOLVAS e FRANÇA, 2009) e um agente anti-histamínico sedativo com propriedades anti-serotoninérgicas fortes e antimuscarínicas fracas. O pizotifeno (Figura 14), normalmente preparado como malato ($C_{19}H_{21}NS.C_4H_6O_5$), é usado no tratamento de enxaqueca para prevenção de ataques de cefaléia em salvas (KOROKOLVAS e FRANÇA, 2009; MARTINDALE, 2009; MERCK, 2006).

Figura 14. Estrutura química do malato de pizotifeno.

Este fármaco é descrito na literatura como fotossensível e já foram feitas tentativas de foto-estabilização desta molécula em solução pela utilização de ácido p-aminobenzóico e ácido ascórbico (ABOUNASSIF, EI-OBEID e GADKARIEM, 2005).

Por outro lado, as ciclodextrinas (CDs), oligossacarídeos cíclicos compostos basicamente por 6, 7 ou 8 unidades de glicose e identificados como α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) ou γ -ciclodextrina (γ -CD) respectivamente, possuem como característica a formação de complexos de inclusão (CI) com diversos tipos de moléculas e têm sido bastante utilizadas para modificar suas propriedades físico-químicas (DAVIS e BREWSTER, 2004; VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006)

Com relação a fotoestabilidade de fármacos, as CDs mostram-se capazes de melhorar a resistência dos mesmos à ação da luz (RAGNO *et al.*, 2003; VALERO e ESTEBAN, 2004), porém, também foi demonstrado que alguns CIs apresentam-se mais instáveis frente à exposição à luz (TØNNESSEN, MÁSSON e LOFTSSON, 2002; VILLAYERDE *et al.* 2007; XIAO *et al.*, 2007). De qualquer modo, o que se verifica é uma ação diferenciada sobre a

fotodegradação de compostos que se deve, basicamente, a dois fenômenos concorrentes: a proteção de grupamentos fotossensíveis devido a sua inclusão na cavidade da ciclodextrina e, por outro lado, o ataque nucleofílico das hidroxilas da CD à molécula complexada, que pode induzir a hidrólise (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

Os complexos de inclusão do PZT com CDs já foram descritos por Al Omari e colaboradores (2008) e a afinidade deste fármaco foi demonstrada mais elevada para β -CD, possuindo uma constante de associação de cerca de 2300 l.mol^{-1} . Entretanto, não existem estudos acerca da capacidade das CDs de melhorar a fotoestabilidade deste fármaco.

Então, o objetivo do presente trabalho é verificar a influência da complexação do PZT com CDs sobre a fotoestabilidade do fármaco em solução aquosa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os reagentes acetonitrila grau cromatográfico, fosfato monobásico de sódio PA, foram da fabricados por Merck® (Darmstadt, Alemanha), o ácido ortofosfórico PA e o octanossulfonato de sódio grau cromatográfico foram fabricados por Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos) e a água ultrapura preparada no laboratório por sistema Milli-Q da Millipore® (Bedford, Estados Unidos). Estes reagentes e o malato de pizotifeno utilizados no presente trabalho foram gentilmente cedidos por Medley Indústria Farmacêutica Ltda (Campinas, Brasil).

2.2. Condições Cromatográficas de Quantificação

Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu (Kioto, Japão) modelo LC-2010C HT com bomba quaternária, sistema desgaseificador, sistema de controle de temperatura das amostras e injetor automático, forno para coluna e detector UV-Visível integrados num único módulo controlado pelo software proprietário LCsolution v. 1.21 SP1.

As separações cromatográficas foram realizadas numa coluna cromatográfica Wakosil II 5C18 RS, 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula igual a $5 \mu\text{m}$, marca SGE (Melbourne, Austrália). A fase móvel utilizada foi uma mistura de solução salina de fosfato

de sódio monobásico e octanossulfonato de sódio (ambos a 2 mmol/l), acetonitrila e trietilamina na proporção 600:400:2 (v/v), respectivamente. O pH da mistura foi acertado para $3,00 \pm 0,05$ com ácido ortofosfórico concentrado. A vazão de trabalho utilizada foi de 1,5 ml/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. Para quantificar o PZT foram feitas medidas em UV no comprimento de onda de 230 nm. O volume de injeção utilizado foi de 20 µl e o suporte de amostras do cromatógrafo foi mantido a 10°C durante todo o período de injeção.

2.3. Obtenção dos complexos de inclusão (CIs)

Foram preparadas soluções aquosas de α -CD, β -CD e γ -CD com PZT na proporção estequiométrica de 1:1. Estas soluções concentradas foram submetidas a agitação por 72 horas a 22°C e ao abrigo da luz. Após agitação, cada solução foi transferida para um evaporador rotativo, adicionada de 10% de seu volume de etanol, submetida a uma corrente de ar em baixa pressão a cerca de 50°C e evaporadas completamente. As amostras removidas do balão do evaporador foram gentilmente uniformizadas num almofariz e lavadas com acetona num sistema de filtração a vácuo.

2.4. Ensaio de fotoestabilidade

Foram preparadas soluções, em duplicata, a partir de PZT puro e dos complexos preparados com o fármaco de modo que a concentração final fosse de 20 µg/ml. Amostras de controle contendo água pura e as três CDs também foram preparadas. Todas as soluções foram filtradas através de filtro tipo Millex® de 0,45 µm, desprezando os primeiros 4 ml de amostra, diretamente para 8 frascos de injeção de vidro transparente e estes foram fechados com tampa e septo.

As amostras foram expostas numa câmara de fotoestabilidade modelo Pharma 500L (Weiss Technik®, Reiskirchen, Alemanha) separadas em 3 grupos: um de referência protegido, outro exposto à luz branca (lâmpadas TL-D 18W/33-640, Philips®, Amsterdã, Holanda) e o terceiro exposto à luz UV (lâmpadas “Blacklight-Blue” modelo F18/BLB-T8, Sylvania®/OSRAM®, Munique, Alemanha). No início do estudo e após 0,5, 1, 4, 8 e 12 dias, foi analisado um frasco de cada grupo.

A recuperação do PZT em cada solução foi calculada pela Equação 6.

$$R[\%] = \frac{A_t}{A_{ref}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde “R[%]” é a recuperação do PZT em %, “A_t” é a área do pico do PZT obtido de cada amostra exposta à luz no período “t” e “A_{ref}” é a área do pico de PZT da amostra de referência no mesmo período.

A partir da recuperação do PZT em cada amostra e período foi feita uma análise da cinética de degradação de 1ª ordem, ajustando os dados à Equação 7.

$$\log_{10}[R(\%)] = -k_{obs} \times t + b \quad \text{Equação 7}$$

Onde “k_{obs}” é a constante observada de degradação do fármaco em solução, “t” é o período de exposição da amostra (em dias) e “b” é o coeficiente linear. Os resultados de regressão para cada amostra foram comparados quanto ao valor de k_{obs}, ao tempo de meia-vida (t_{1/2}) e ao fator de proteção relativa (referente ao decaimento da amostra de PZT puro).

2.5. Análise espectral

Para análises de pureza espectral e pureza de pico foi usado um cromatógrafo Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemanha) modelo LaChrom ELITE, com bomba quaternária L2130 com sistema desgaseificador, injetor automático L2200 com sistema de controle de temperatura das amostras, forno para coluna L2300 e detector de arranjo de diodos (DAD) L2455, controlados pelo software EZChrom ELITE v. 3.1.7 (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

Os cromatogramas obtidos com as amostras de matéria-prima fotodegradada foram utilizados para montar uma biblioteca espectral com os dados dos picos de degradação mais representativos e os picos com o mesmo tempo de retenção foram comparados quanto ao perfil espectral.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma ilustração sobre como um determinado fármaco pode sofrer degradação quando em presença de ciclodextrinas é apresentado na Equação 8, adaptada de del Valle (2004) e Loftsson e Brewster (1996).

Equação 8

Neste modelo, “F” representa o fármaco, “CD” representa a ciclodextrina livre, “F_nCD_m” o complexo de inclusão (CI) fármaco-ciclodextrina, “k^F” é a constante de fotodegradação do fármaco livre, “k^{CPX}” é a constante de fotodegradação do fármaco no complexo com a ciclodextrina, “K_c” é a constante de estabilidade do CI, “K_d” é a constante de dissociação, “m” e “n” são as quantidades estequiométricas relativas de fármaco e ciclodextrina respectivamente, “PD^(1,2...n)” são os produtos de fotodegradação do fármaco e “hν” representa a energia luminosa incidente.

O modelo proposto resume as possíveis influências da complexação de fármacos com ciclodextrinas sobre a fotoestabilidade destes em solução. As constantes de K_c e K_d controlam a quantidade de fármaco livre e complexado em solução, enquanto k^F e k^{CPX} controlam a velocidade de fotodecomposição do fármaco. Se k_λ^{CPX} < k_λ^F a velocidade observada de fotodegradação de uma solução do CI será menor que a de uma solução do fármaco puro e vice versa (LOFTSSON e BREWSTER, 1996).

A análise cromatográfica das amostras expostas demonstrou que a área do pico relativo ao PZT sofre uma redução ao longo do tempo enquanto os picos dos produtos de degradação tornam-se cada vez mais intensos (Figura 15).

Figura 15. Aumento da intensidade de três picos de produtos de degradação ao longo do estudo de exposição à luz de PZT puro em 230 nm. As curvas são crescentes e referem-se às amostras analisadas no início (inferior) e após 2, 4, 8 e 12 dias nas cores preto, rosa, azul, vermelho e verde respectivamente.

Os resultados das recuperações para as amostras em cada tipo de exposição são apresentados na Tabela 4 e representados na Figura 16 e na Figura 17 para a exposição à luz branca e UV respectivamente.

Tabela 4. Resultados da recuperação média e desvio padrão (n=2) para fotodegradação de soluções contendo PZT, α -CPX, β -CPX e γ -CPX (continua).

Amostra	Período [dias]	Luz Branca		Luz UV	
		R [%]	DP [%]	R [%]	DP [%]
PZT	0,5	94,22	0,65	93,71	0,52
	1	93,14	0,14	88,59	0,37
	2	90,33	1,71	83,67	4,53
	4	78,84	1,09	62,46	0,76
	8	55,94	3,12	35,86	0,80
	12	25,49	1,20	9,79	0,78
α -cpx	0,5	95,65	1,37	95,04	0,65
	1	94,85	0,30	91,75	0,51
	2	87,32	0,76	78,66	1,68
	4	77,74	5,34	67,14	2,70
	8	53,06	4,77	44,90	0,05
	12	45,94	17,70	14,71	1,44
β -cpx	0,5	98,19	0,93	95,40	2,18
	1	94,86	0,60	93,79	3,29
	2	91,36	1,11	83,77	0,31
	4	78,59	2,04	74,44	2,34
	8	58,95	3,62	51,95	5,32
	12	43,54	7,38	23,36	0,79
γ -cpx	0,5	95,86	2,39	94,07	0,92
	1	96,24	1,45	92,03	2,60
	2	97,43	1,01	88,94	3,87
	4	78,84	7,02	65,57	7,27
	8	58,22	0,85	39,79	3,26
	12	37,89	4,44	17,79	3,63

Figura 16. Decaimento da concentração de PZT ao longo do tempo (dias) para as amostras de PZT puro, α-CPX, β-CPX e γ-CPX expostas à luz branca. O eixo vertical representa o valor de $\log_{10}[R(\%)]$ (adimensional) e o eixo horizontal o período de exposição (em dias).

Figura 17. Decaimento da concentração de PZT ao longo do tempo (dias) para as amostras de PZT puro, α-CPX, β-CPX e γ-CPX expostas à luz UV. O eixo vertical representa o valor de $\log_{10}[R(\%)]$ (adimensional) e o eixo horizontal o período de exposição (em dias).

Através do detector de DAD é possível verificar a presença de dois compostos de degradação com sinais mais significativos durante o experimento: o primeiro em cerca de

3,14 minutos (IMP-1) e outro em cerca de 3,73min (IMP-2), visualizados através dos mapas de comprimento de onda *versus* tempo de corrida (Figura 18). As análises espectrais de IMP-1 e IMP-2 são exemplificadas nas Figura 19(a) e Figura 19(b).

Figura 18. Mapa de absorção relativo ao comprimento de onda (eixo vertical) *versus* tempo de corrida obtido de uma amostra de PZT puro após 8 dias de exposição. A intensidade dos picos é dada em função da escala de cores. As impurezas IMP-1 e IMP-2 estão marcadas.

Figura 19. Exemplo de comparação espectral (intensidade *versus* comprimento de onda) efetuada em DAD para IMP-1 (a) e IMP-2 (b), entre soluções de PZT puro (azul) e β -CPX (verde) após respectivamente 8 e 12 dias de exposição à luz visível.

As análises espectrais realizadas mostraram similaridades maiores que 0,999 entre os espectros das impurezas monitoradas nas amostras expostas à luz branca e UV, indicando que a fotólise do PZT ocorre através do mesmo mecanismo independentemente da presença das CDs e do tipo de luz utilizada.

Os valores estimados da constante de degradação observada, $t_{1/2}$, e proteção relativa do PZT nas amostras expostas à luz branca e UV são apresentados na Tabela 5 juntamente com

os valores de r^2 (maiores que 0,9 em todos os casos, indicando a qualidade dos ajustes de curva efetuados).

Tabela 5. Resultados de k_{Obs} , r^2 , $t_{1/2}$ (em dias) e Proteção Relativa para as amostras de PZT, α -CPX, β -CPX e γ -CPX.

Amostras	Luz Branca				UV			
	k_{Obs}	r^2	$T_{1/2}$ [dias]	Proteção Relativa	k_{Obs}	r^2	$T_{1/2}$ [dias]	Proteção Relativa
PZT	4,782E-02	0,936	6,3	1,0	8,224E-02	0,951	3,7	1,0
α -cpx	3,191E-02	0,987	9,4	1,50	6,648E-02	0,941	4,5	1,24
β -cpx	3,155E-02	0,997	9,5	1,52	5,102E-02	0,954	5,9	1,61
γ -cpx	3,641E-02	0,977	8,3	1,31	6,371E-02	0,980	4,7	1,29

Os valores de k_{Obs} são, no mínimo, 20% menores para as amostras dos CIs em relação ao PZT puro para as amostras expostas à luz branca e UV, indicando que a formação destes complexos em solução aquosa é capaz de conferir ao fármaco uma menor velocidade de degradação em relação ao PZT puro. A magnitude da fotoproteção varia na seguinte ordem: β -CPX > α -CPX $\approx$ γ -CPX > PZT e não se altera entre os tipos de exposição.

A amostra β -CPX apresentou uma proteção relativa superior àquela observada para os demais complexos, especialmente quando a amostra foi exposta à luz UV, com 1,61 (30% maior proteção que a apresentada pelas demais CDs, resultado que coincide com a maior constante de estabilidade do complexo do PZT com a β -CD conforme descrito por Al-Omari *et al.* (2008). Apesar da intensidade da proteção ser inferior à observada por Abounassif, El-Obeid e Gadkariem (2005) com amostras contendo ácido p-aminobenzoico e ácido ascórbico a complexação com CDs mostra-se potencialmente capaz de melhorar a fotoestabilidade do PZT quando em solução aquosa.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que a complexação com ciclodextrinas em solução aquosa foi capaz de modificar a fotoestabilidade do PZT, reduzindo sua velocidade de degradação de 19% a 38% quando exposto à luz branca e UV. Neste caso o aumento da fotoestabilidade também foi proporcional à afinidade do fármaco com cada tipo de ciclodextrina, sendo superior para o complexo formado com β -CD.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[‡]

- [1] ABOUNASSIF, M.A.; EL-OBEID, H.A.; GADKARIEM, E.A. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.36, p.1011-1018, 2005.
- [2] AL OMARI, M.M.; EL-BARGHOUTH, M.I.; ZUGHUL, M.B.; DAVIES, J.E.D.; BADWAN, A.A. Comparative study of the inclusion complexation of pizotifen and ketotifen with native and modified cyclodextrins. Journal of Solution Chemistry, v.37, p.249-264, 2008.
- [3] DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. Nature Reviews Drug Discovery, v.3, p.1024-1035, 2004.
- [4] DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, v.39, p.1033-1046, 2004.
- [5] GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; MORAES, C.M.; LIMA, R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Study of interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.47, p.295-302, 2008.
- [6] KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. Dicionário terapêutico Guanabara: 2008-2009. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 686p.
- [7] LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.85, n.10, p.1017-1025, 1996.
- [8] MARTINDALE: The complete drug reference. Disponível em: <http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/ms-14855-k.htm>. Acesso em: 24 nov. 2009.
- [9] MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p. 1347.

[‡] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- [10] POMPONIO, R.; GOTTI, R.; FIORI, J.; CAVRINI, V.; MURA, P.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F. Photostability studies on nicardipine-cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.35, p.267-275, 2004.
- [11] RAGNO, G.; CIONE, E.; GAROFALO, A.; GENCHI, G.; IOELE, G.; RISOLI, A.; SPAGNOLETTA, A. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. International Journal of Pharmaceutics, v.265, p.125-132, 2003.
- [12] TØNNESSEN, H.H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. International Journal of Pharmaceutics, v.244, p.127-135, 2002.
- [13] VALERO, M.; ESTEBAN, B. Effect of binary and ternary polyvinylpyrrolidone and/or hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes on the photochemical and photosensitizing properties of Naproxen. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, v.76, p.95-102, 2004.
- [14] VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. 228p.
- [15] VILLAVERDE, J.; MAQUEDA, C.; UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E. Effect of various cyclodextrins on photodegradation of a hydrophobic herbicide in aqueous suspensions of different soil colloidal components. Chemosphere, v.69, p.575-584, 2007.
- [16] XIAO, J.; WANG, G.; XUE, X.; WU, F.; LUAN, H.; DENG, N. Enhanced photodegradation behavior of bisphenol f in the presence of β -cyclodextrin under UV light. Environmental Engineering Science, v.24, n.6, p.812-820, 2007.