

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

Caracterização, análise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametasona

Bruno Augusto Leite Evangelista

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª. Titular Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2010

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

E92c Evangelista, Bruno Augusto Leite
Caracterização, análise físico-química e estabilidade térmica
do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametasona
/ Bruno Augusto Leite Evangelista. -- São Paulo, 2010.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria

1. Droga : Propriedade físico-química I. T. II. Kedor-Hackmann,
Érika Rosa Maria, orientador.

615.19 CDD

Bruno Augusto Leite Evangelista

Caracterização, análise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão ciclodextrina-17-valerato de betametasona

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof.^a Titular Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientadora/presidente

1.º examinador

2.º examinador

_____ São Paulo, _____ de 2010

Dedico esta dissertação a Deus, por ter me dado a oportunidade e me auxiliado a trilhar este caminho, a minha noiva com quem sempre pude contar, e que tanto me ajudou na parte sentimental e intelectual. Meus pais e avós, por terem fornecido a base da pessoa que sou, e em especial a meu avó Mário que sempre me incentivou a andar pelos caminhos do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann, sinceros agradecimentos pela orientação, constante auxílio e parceria durante todas as etapas deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Inês de Almeida Gonçalves, pela colaboração e preciosas sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Laboratórios Stiefel pelo apoio e parceria, disponibilizando equipamentos e reagentes utilizados neste trabalho, além do crédito em acreditar no trabalho que viria a ser desenvolvido.

Ao colega de Pós-Graduação e trabalho, Hélio Sálvio Neto pelo apoio, cooperação, incentivo e luz à pesquisa científica.

A bibliotecária Leila, pela correção das referências bibliográficas.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

E finalmente, a Deus, que vem me proporcionando grandes vitórias.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1 – Estrutura molecular do princípio ativo 17-valerato de betametasona.	1
Figura 2 – Principais vias de biossíntese dos corticosteróides e androgênios supra-renais.	7
Figura 3 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides a nível celular.	10
Figura 4 – Estrutura molecular da ciclodextrina.	13
Figura 5 – Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão fármaco-CD.	15
Figura 6 – Unidade de α -D-(+)-glicopiranoose, com numeração dos átomos. N = 6 a 8.	34
Figura 7 – Representação dos diagramas de solubilidade de fases em B_S , B_I , A_L , A_P e A_N . S_0 , S_I e S_C correspondem, respectivamente, a solubilidade da molécula hóspede na ausência de CD em equilíbrio, a concentração em equilíbrio da molécula hóspede solubilizada (livre e complexada) e o limite de solubilidade do complexo formado.	36
Figura 8 – Sistema de CLAE com detector de DAD Agilent/HP 1100 series.	39

Figura 9 – Equipamento de DSC 204 F1 Phoenix da Netzsch.	43
Figura 10 – TG 209 F1 Iris da Netzsch.	44
Figura 11 –. Espectrofotômetro GX FT-IR da Perkin-Elmer.	45
Figura 12 –. Sistema de RMN de 300MHz da Bruker.	46
Figura 13 – Curva de calibração obtida pela técnica de CLAE, para determinação de 17-valerato de betametasona.	48
Figura 14 – Espectro cromatográfico em 3D, obtido em detector DAD. Mistura física princípio ativo e CD.	48
Figura 15 – Cromatografia nos comprimentos de onda de 254nm e 240nm. γ -ciclodextrina. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C, volume de injeção de 10 μ L, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5 μ m (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].	50
Figura 16 – Cromatografia no comprimento de onda de 254nm. 17-valerato de betametasona. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C, volume de injeção de 10 μ L, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5 μ m (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].	51

- Figura 17** – Cromatografia no comprimento de onda de 254nm. 17-valerato de betametasona e 21-valerato de betametasona. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C , volume de injeção de 10µL, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5µm (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)]. 52
- Figura 18** – Diagrama de solubilidade de fases das três CDs estudadas (γ -CD, metil- β -CD e β -CD) em diferentes razões de fármaco-CD. 53
- Figura 19** – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Evento endotérmico de fusão do princípio ativo 17-valerato de betametasona. 55
- Figura 20** – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Evento endotérmico de fusão da γ -CD. 56
- Figura 21** – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Eventos endotérmicos de fusão do PA e γ -CD, em mistura física (1:1). 57
- Figura 22** – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Amostras de referência de 17-valerato de betametasona (azul), γ -CD (vermelho), 17-valerato de betametasona e γ -CD em mistura (1:1) (verde) e complexo de inclusão G (bege). 58

- Figura 23** – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Amostras A-I, e ausência de evento endotérmico de fusão à ~195°C. 59
- Figura 24** – Espectro de infravermelho médio com transformada de Fourier, em 17-valerato de betametasona (vermelho), mistura física (1:1) (azul), complexo de inclusão G (verde) e γ -CD (rosa). Faixa espectral de 7800 – 370cm⁻¹, intervalo de 1,0cm⁻¹ e resolução de 4,0cm⁻¹, disperso em óleo mineral. 61
- Figura 25** – Ressonância magnética nuclear em γ -CD. ¹H RMN, 300MHz, em DMSO. 65
- Figura 26** – Ressonância magnética nuclear em complexo de inclusão A. ¹H RMN, 300MHz. 66
- Figura 27** – Ressonância magnética nuclear em γ -CD. ¹H RMN, 300MHz, em DMSO. 69
- Figura 28** – Ressonância magnética nuclear em complexo de inclusão G. ¹H RMN, 300MHz. 70
- Figura 29** – Estrutura molecular do princípio ativo 17-valerato de betametasona, com a numeração de seus carbonos. 71
- Figura 30** – Ressonância magnética nuclear em 17-valerato de betametasona. ¹H RMN, 300MHz. 72
- Figura 31** – Ressonância magnética nuclear em 17-valerato de betametasona. ¹³C RMN, 300MHz. 73
- Figura 32** – Ressonância magnética nuclear em VB, γ -ciclodextrina, complexo de inclusão A e complexo de inclusão G. ¹³C RMN, 300MHz. 76

- Figura 33** – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o princípio ativo 17-valerato de betametasona. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar. 77
- Figura 34** – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o complexo de inclusão G. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar. 78
- Figura 35** – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o complexo de inclusão A. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar. 79
- Figura 36** – Perfil de degradação e linha de tendência do 17-valerato de betametasona nas temperaturas de 25, 175, 205 e 220°C. 80
- Figura 37** – Perfil de degradação e linha de tendência do complexo de inclusão A nas temperaturas de 25, 180 e 220°C. 80
- Figura 38** – Perfil de degradação e linha de tendência do complexo de inclusão G nas temperaturas de 25, 140, 160 e 175°C. 81

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
Tabela 1 – Comparativo entre glicocorticóides em relação a sua dose equivalente, potenciais antiinflamatórios e mineralocorticóide e meia-vida.	12
Tabela 2 – Usos comerciais de ciclodextrinas em medicamentos (Szejtli, 2004).	18
Tabela 3 – Razões molares utilizadas de VB e diferentes tipos de ciclodextrinas, para o teste de solubilidade de fases.	38
Tabela 4 – Descrição resumida das metodologias utilizadas no processo de formação dos complexos de inclusão, e códigos adotados para cada amostra.	42
Tabela 5 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão A, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 70°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.	63
Tabela 6 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão A, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 25°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.	64
Tabela 7 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão G, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 70°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.	67

Tabela 8 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão G, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 25°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa. 68

Tabela 9 – Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C e ^1H teóricos baseados no software "CHEMOFFICE 2007", em relação aos deslocamentos químicos experimentais. Onde: *s* = singleto, *d* = duplete, *t* = tripleto e *m* = multiplete. 74

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO DA PESQUISA.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 CORTICOESTERÓIDES E 17-VALERATO DE BETAMETASONA.....	5
3.1.1 Síntese e metabolismo.....	6
3.1.2 Propriedades farmacológicas.....	8
3.2 CICLODEXTRINAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	13
3.2.1 Estrutura molecular e complexação.....	13
3.2.2 Usos e vantagens das ciclodextrinas.....	16
3.2.3 Toxicologia.....	20
3.2.4 Derivados de ciclodextrinas.....	23
3.2.5 Desenvolvimento atual de trabalhos com ciclodextrinas.....	24
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	25
3.4 ANÁLISES TÉRMICAS.....	27
3.5. INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	29
3.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Matérias-Primas e Padrões de Referência.....	34
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Seleção da CD.....	35
4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	39

4.2.3	Obtenção dos complexos.....	40
4.2.4	Análises térmicas.....	42
4.2.5	Infravermelho médio com transformada de Fourier.....	44
4.2.6	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

RESUMO

A preparação de formulações contendo o princípio ativo 17-valerato de betametasona (VB) é amplamente difundida entre as indústrias farmacêuticas, por se tratar de fármaco antiinflamatório de escolha, no tratamento de condições em que a terapia com corticoesteróides é indicada. Muito empregado no tratamento tópico de condições alérgicas e inflamatórias dos olhos, orelhas e nariz, inalação para a profilaxia da asma e também em veterinária. Isto devido ao seu alto poder antiinflamatório, quando comparado a outros corticoesteróides, e sua falta virtual de propriedades mineralocorticóides, causando baixa retenção de sódio e, subsequentemente, de água.

Conforme descrita na Farmacopéia Americana USP 32 – NF 27, o princípio ativo 17-valerato de betametasona hidrolisa-se em seu isômero 21-valerato de betametasona, seu principal produto de degradação, que possui baixo poder antiinflamatório. Adicionalmente, a norma brasileira em vigência para estudos de estabilidade de medicamentos, RE n°1, de 29 de Julho de 2005, propõe condições estressantes para estudo de estabilidade de longa duração (30°C/75%UR), o que acelera a reação de hidrólise (degradação) do princípio ativo. Conhecidamente, estudos prévios mostram que formulações tópicas contendo o VB (loção, creme, solução e pomada) apresentam uma estabilidade curta. Assim, uma forma de estabilizar o VB é a complexação (inclusão), com compostos de ciclodextrina (CD).

O objetivo deste projeto foi estabelecer procedimentos para a obtenção, caracterização físico-química e avaliação de estabilidade térmica do complexo sólido supracitado. Para atender este objetivo técnicas de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria), infravermelho médio com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência, fizeram-se necessárias.

Palavras-chaves: Ciclodextrina. 17-valerato de betametasona. Análise térmica. Ressonância magnética nuclear. Estabilidade térmica.

ABSTRACT

Preparation of formulations containing the active ingredient betamethasone 17-valerate (VB) is widely defunded within pharmaceutical industry, once it concerns an anti-inflammatory drug and an option, in the treatment of conditions in which corticosteroids therapy is indicated. Often employed in topical treatment of eye, ear and nose allergic and inflammatory conditions, inhalation for asthma prophylaxes, and also in veterinary. This because its high anti-inflammatory activity, when compared to others corticosteroids, and its virtual lack of mineralocorticoids properties, causing a low sodium retention and, subsequently, of water.

As described in the United States pharmacopeia USP 32 – NF 27, the active ingredient betamethasone 17-valerate hydrolyses into its isomer betamethasone 21-valerate, its main degradation product, that has a low anti-inflammatory activity . Additionally, the Brazilian legislation for drug products stability study, RE n°1, July 29th 2005, introduce long term stability study stressing conditions (30°C/75%RH), accelerating the reactive hydrolysis (degradation) for the active ingredient. Well known, previous studies show that topical formulations containing VB (lotion, cream, solution and ointment) presents a short stability. Complexation (inclusion) with cyclodextrin (CD) compounds shows a reasonable way to improve the VB stability.

The project objective is to establish procedures for the obtainment, physicochemical characterization and solid complex (cited above) thermal stability evaluation. In order to achieve this objective thermal analysis techniques (differential scanning calorimetry and thermogravimetry), Fourier transformation middle infrared, nuclear magnetic resonance and high performance liquid chromatography, were needed.

Key words: Cyclodextrin. Betamethasone-17-valerate. Thermal analysis. Nuclear magnetic resonance. Thermal stability.

1. INTRODUÇÃO

O princípio ativo 17-valerato de betametasona (Fig.1) é um potente corticoesteróide com ação principalmente glicocorticóide, amplamente utilizado no tratamento de condições em que a terapia com corticoesteróides é indicada (ampla atividade no sistema imune, antiinflamatória e vasoconstritora). Sua virtual falta de propriedades mineralocorticóides torna-o particularmente apropriado para o tratamento de doenças em que se deve evitar a retenção de água (devido à retenção de sódio). Entre os corticoesteróides, a betametasona possui uma ação prolongada e uma potência antiinflamatória superior. Adicionalmente, sua meia-vida plasmática é maior que 300 minutos e sua meia-vida biológica, está situada entre 36-54 horas. Apesar de suas características farmacológicas notáveis, os 17- α monoésteres corticoesteróides são instáveis e na presença de ácido ou base, podem sofrer uma migração do grupo acila para o correspondente 21-monoéster (Gardi *et al.*, 1963; Vitali & Gardi, 1972; Yip & Po, 1979; Bundgaard & Hansen, 1981; Anderson & Taphouse, 1981 e Yip *et al.*, 1983; Andersen & Bundgaard, 1984).

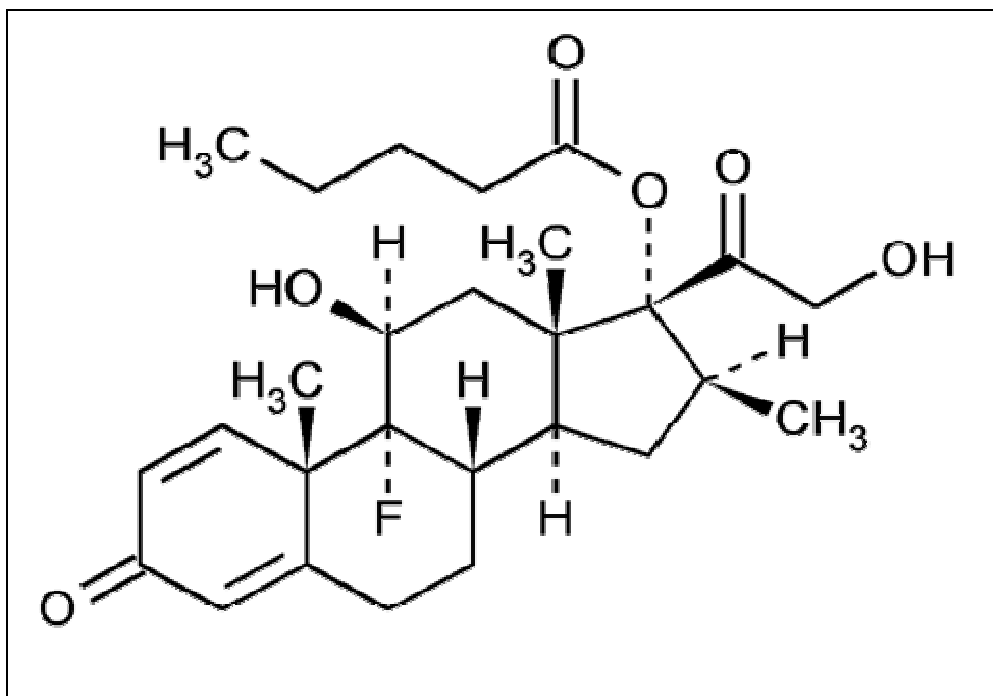


Figura 1 – Estrutura molecular do princípio ativo 17-valerato de betametasona (Farmacopéia americana, Vol.32).

Foi observado em algumas pomadas extemporâneas diluídas, que a meia-vida do 17-valerato de betametasona pode ser de apenas de poucas horas à temperatura ambiente (Yip & Li, 1979; Ryatt *et al.*, 1982; Andersen & Bundgaard, 1984).

Para atender a necessidade de estabilizar a molécula de 17-valerato de betametasona, podem ser elaborados complexos de inclusão com ciclodextrinas (CD). A molécula inteira ou uma porção desta ficará complexada ao interior da CD aumentando a sua estabilidade, impedindo teoricamente sua degradação para um produto menos ativo.

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, e são moléculas utilizadas na formação de complexos de inclusão do tipo hóspede/hospedeiro. A molécula inteira ou parte dela fica complexada à CD, podendo assim aumentar a estabilidade química do fármaco.

Apesar do grande número de trabalhos desenvolvidos na linha de pesquisa de compostos de inclusão com CDs, a caracterização dos complexos constitui ainda hoje uma etapa delicada no processo de síntese (Britto *et al.*, 2004).

Faz-se necessário estabelecer procedimentos para a caracterização físico-química deste complexo de inclusão formado, através das técnicas de análise térmica, infravermelho médio e ressonância magnética nuclear, e outras. Adicionalmente, avaliar a estabilidade térmica do complexo utilizando análise térmica. Além de ser possível evidenciar a cinética de degradação deste composto, existe a possibilidade de se prever seu prazo de validade, fornecendo informações físicas e químicas sobre o composto (Araujo *et al.*, 2003).

Ao se evidenciar a cinética de degradação deste composto, existe a possibilidade de se determinar, seu prazo de validade.

O estudo de pré-formulação realizado com as técnicas de TG/DTG e DSC, associadas a outras técnicas tais como espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios-X, entre outras, permite não somente verificar as possíveis interações físicas e químicas entre os componentes da formulação, mas ainda identificar os produtos intermediários que estão sendo formados (Araujo *et al.*, 2003).

Todos estes fatores, associados ao estudo de reação de decomposição térmica pelo método isotérmico termogravimétrico (TG) que utiliza a clássica equação de Arrhenius, são fundamentais para predizer de maneira mais rápida a estabilidade física e química de um produto (Souza *et al.*, 2002).

Assim, estudos no tipo de CD e complexação utilizados, técnicas aplicadas para a caracterização química do complexo de inclusão, e avaliação da estabilidade térmica do complexo, serão fundamentais para garantir a qualidade do complexo. Com vantagens expressivas em comparação ao fármaco livre.

O projeto permitiu também o desenvolvimento de um trabalho de pesquisa colaborativo entre a Universidade e a Indústria Farmacêutica, gerando um sinergismo positivo e um incentivo à pesquisa científica no país.

2. OBJETIVO DA PESQUISA

O objetivo deste projeto foi estabelecer procedimentos para a obtenção, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade térmica do complexo de inclusão sólido 17-valerato de betametasona:CD. Para atingir este objetivo técnicas de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria), infravermelho médio com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência, foram estudadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CORTICOESTERÓIDES E 17-VALERATO DE BETAMETASONA

Os corticoesteróides possuem ampla atividade antiinflamatória e no sistema imunológico, suprimindo a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Possuem atividade anti-proliferativa e vasoconstritora, inibindo a proliferação de vários tipos celulares, incluindo linfócitos T, e por apresentarem efeito vasoconstritor nos capilares da derme, contribuem para a redução do eritema no local lesionado em uso tópico (Goodman & Gilman, 1996). Os corticoesteróides atravessam a membrana citoplasmática e se ligam a receptores do citoplasma (receptores glucocorticóides). Estes complexos formados atravessam a membrana nuclear e passam a agir sobre o DNA, mudando a expressão genética. Também se associam a co-ativadores transcriptacionais, permitindo a remodelagem da atividade e aumentando a transcrição genética. A afinidade de cada um destes fármacos por um receptor nuclear específico varia de uma molécula para outra, resultando em efeitos variáveis. A ação dos corticoesteróides leva também a inibição de citocinas inflamatórias tais como interleucina-1 e aumento da produção intracelular licoportina, inibindo a atividade da fosfolipase A₂. Como resultado, ocorre a redução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL)-1 β , IL-4, IL-5, IL-8 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e ainda redução de prostaglandinas e leucotrienos (Goodman & Gilman, 1996).

De acordo com Goodman & Gilman, 1996, no organismo humano, o córtex supra-renal é responsável pela excreção de esteróides (hormônios endógenos), que tem como principais ações disponibilizar ou facilitar a ação de outros hormônios, e também responder a situações emergências de perigo frente ao meio externo, sendo indispensáveis para a sobrevivência de qualquer animal. Estes esteróides são majoritariamente representados pelos hormônios de atividade mineralocorticóide e glicocorticóide.

Os hormônios mineralocorticóides, representados principalmente pela aldosterona, possuem a habilidade de afetar o equilíbrio eletrolítico.

Já os hormônios glicocorticóides, representado principalmente pela hidrocortisona e corticosterona, afetam o metabolismo dos carboidratos e proteínas.

3.1.1 Síntese e metabolismo

O colesterol obtido principalmente do plasma e encontrado nos grânulos lipídicos das células da camada média do córtex supra-renal é o precursor para a síntese dos glicocorticóides (Fig.2). A primeira etapa, limitante em termos de velocidade e regulado pelo ACTH, consiste na conversão de colesterol em pregnenolona.

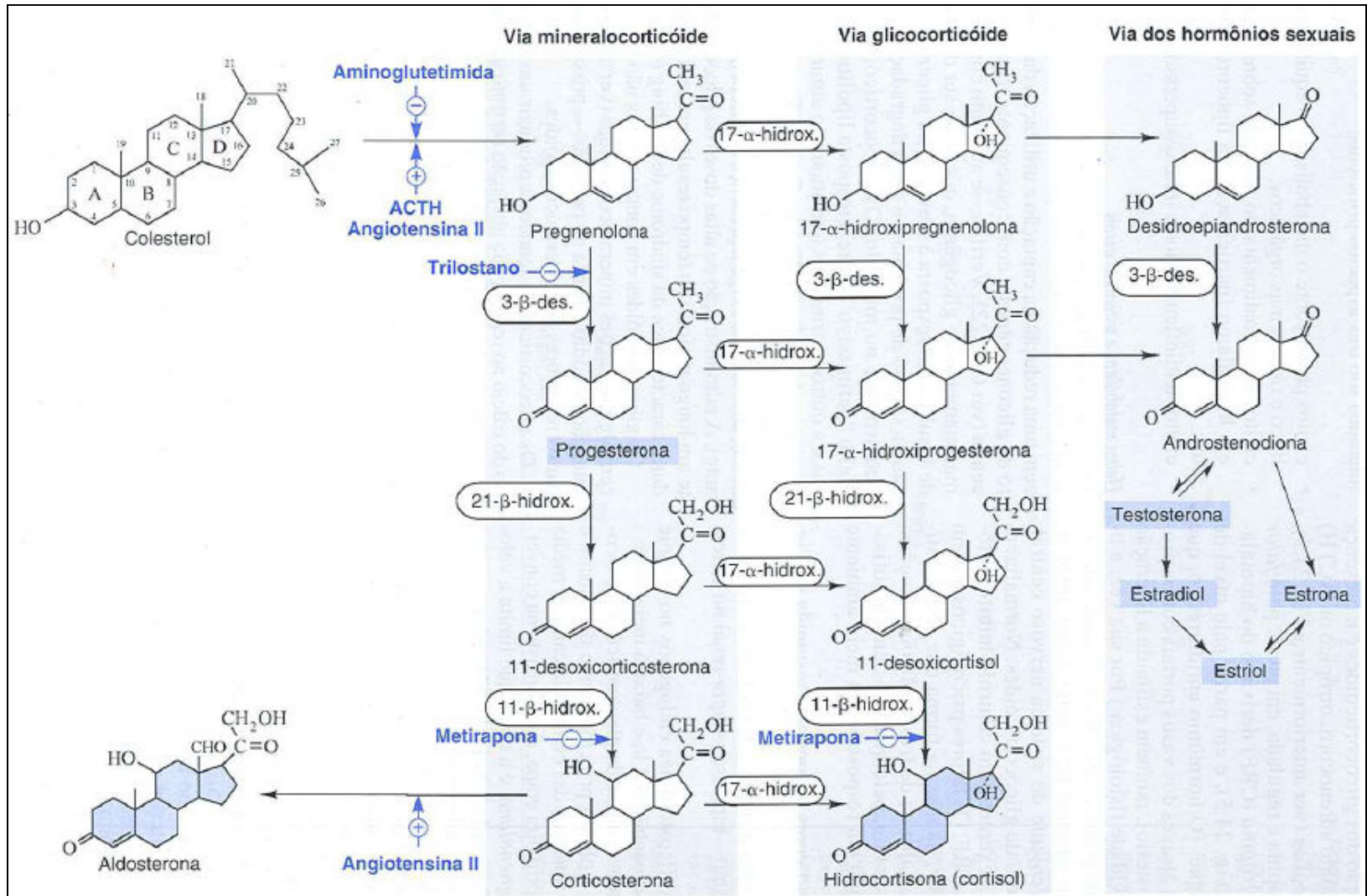


Figura 2 – Principais vias de biossíntese dos corticosteróides e androgênios supra-renais (Rang *et al*, 2001)..

A síntese do colesterol se dá no próprio córtex supra-renal, e estes esteróides não são armazenados na forma de hormônios pré-formados, mas sim, controlados de acordo com a necessidade pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) ou corticotropina secretado pela adeno-hipófise. A secreção deste último hormônio é controlada parcialmente pelo fator de liberação da corticotropina (CRF) e pelo nível de glicocorticóides sanguíneos. Por fim, o fator de liberação da corticotropina é controlado pelos níveis de glicocorticóides, em menor grau, pelo nível de corticotropina sanguíneo, e influxo proveniente do sistema nervoso central.

Quanto aos efeitos metabólicos, é perceptível a tendência a hiperglicemia devido à redução na captação de glicose e aumento na gliconeogênese. Como um efeito cascata é possível observar um aumento no armazenamento de glicogênio devido à secreção de insulina e consequente elevação da glicemia. Adicionalmente, aumento na degradação das proteínas, principalmente de músculos e redução na síntese protéica. Os glicocorticóides atuam favoravelmente à resposta lipolítica das catecolaminas e outros hormônios, induzindo a ativação da lipase de uma quinase monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) dependente, cuja síntese é glicocorticóide-dependente. Assim, as catecolaminas e outros hormônios atuam no aumento da concentração intracelular de cAMP.

Além disso, os glicocorticóides produzem um equilíbrio negativo do cálcio reduzindo sua absorção no trato gastrointestinal e aumentando sua excreção renal.

3.1.2 Propriedades farmacológicas

Os glicocorticóides possuem efeitos farmacológicos gerais sobre o metabolismo, atuando como antiinflamatórios, imunossuppressores, equilíbrio hidroeletrólítico (em menor grau que os mineralocorticóides, porém ainda presente) e na retroalimentação negativa sobre a adeno-hipófise e o hipotálamo.

Na terapêutica, os glicocorticóides mostram-se poderosos nos efeitos antiinflamatórios e imunossuppressores. Atuando eficazmente em todas as fases da resposta inflamatória desde as iniciais (calor, dor e vermelhidão) às posteriores de

cicatrização, sejam elas causadas por patógenos, estímulos físicos e químicos ou respostas imunes exacerbadas, e ainda nas reações proliferativas da inflamação crônica.

De acordo com Rang *et al.*, 2001, a terapêutica com glicocorticóides no tratamento de hipersensibilidade e inflamação exacerbada, deve ser cogitada visto a ação potencial dos glicocorticóides.

O mecanismo de ação dos glicocorticóides envolve a interação entre os esteróides e os receptores intracelulares pertencentes à família de receptores que controlam a transcrição gênica (Fig. 3). Após penetrarem a célula, estes se ligam a receptores citoplasmáticos específicos, em seguida a interação o receptor sofre alteração na sua conformação expondo um domínio de ligação ao DNA, reprimindo ou induzindo genes particulares. O transporte dos glicocorticóides endógenos no plasma dá-se pela ligação destes com globulinas de ligação dos corticosteróides (CBG) e a albumina. As globulinas de ligação dos corticosteróides são responsáveis por cerca de 77% da hidrocortisona ligada. Já a albumina possui menor afinidade pela hidrocortisona, e liga-se tanto a esteróides naturais quanto sintéticos.

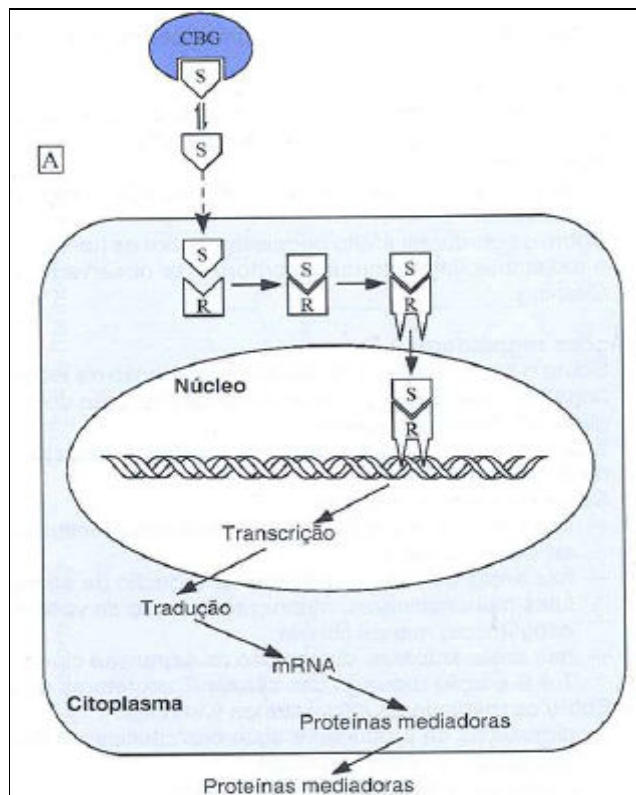


Figura 3 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides a nível celular (Rang *et al.*, 2001).

A nível celular as ações dos glicocorticóides sobre as células inflamatórias são uma menor saída de neutrófilos dos vasos sanguíneos, e redução da atividade dos neutrófilos e macrófagos devido à transcrição diminuída dos genes dos fatores de adesão celular e das citocinas relevantes.

A ação sobre os mediadores inflamatórios e imunes são a diminuição na produção de prostanóides, citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- γ e fatores de adesão celular, óxido nítrico induzido, imunoglobulina G (IgG). Redução na concentração plasmática de componentes do complemento e menor liberação de histamina pelos basófilos.

Os efeitos indesejáveis são relacionados a dosagens altas ou administração prolongada. Os principais efeitos encontrados são: supressão da resposta à infecção ou lesão, supressão da síntese de corticosteróides, além da alteração do equilíbrio hidroeletrólítico e sistemas orgânicos (entre elas a osteoporose e desenvolvimento de atrofia muscular).

A administração dos glicocorticóides dá-se através de praticamente todas as vias, e por serem moléculas relativamente pequenas e lipofílicas penetram nas células-alvo por simples difusão.

Os corticoesteróides são indicados para tratamento de desordens endócrinas (hidrocortisona e cortisona são os fármacos de escolha; análogos sintéticos podem ser utilizados em conjunto com mineralocorticóides), desordens reumáticas, doenças de colágeno, doenças dermatológicas [e.g., *Pemphigus*, eritema multiforme severa (síndrome de Stevens-Johnson)], micoses fungoides, psoríase severa, angiodema ou urticária, e dermatite atópica, seborréica severa, de contato ou esfoliativa, estados alérgicos, processos inflamatórios alérgicos, oftálmicos, doenças respiratórias, desordens hematológicas, doenças neoplásicas, estados de edema, doenças gastrointestinais, sistema nervoso, administração intra-articular, intralesional, meningite tuberculóide. Outras doenças dermatológicas, em que os corticoesteróides são fármacos de escolha são: “*lichen planus*” associado ao prurido severo, alopecia areata, desordens granulomatosas, infiltração linfocítica da pele, pustulose e palmoplantares.

A betametasona é um corticoesteróide com ação predominantemente glicocorticóide. Seu uso, tanto na forma de álcool livre ou em uma de suas formas esterificadas é indicada no tratamento de condições em que a terapia com corticoesteróides é necessária, exceto estados de *bullous dermatitis herpetiformis* e deficiência adrenal em que a hidrocortisona com fludrocortisona é a terapia de escolha. A betametasona é particularmente apropriada para o tratamento de condições em que a retenção de água seria uma desvantagem, devido à retenção de sódio. Os derivados fluorados (e.g., fluocinonida, betametasona, triamcinolona) são mais potentes e causam menos retenção de sódio, quando comparados aos demais corticoesteróides. Entre os derivados da betametasona está o dipropionato de betametasona, porém esse fármaco possui uma atividade antiinflamatória significativamente menor quando comparado ao derivado 17-valerato de betametasona. Na Tabela 1 é possível observar com maior detalhe as equivalências dos glicocorticóides que foram supracitadas.

Tabela 1 – Comparativo entre glicocorticóides em relação a sua dose equivalente, potenciais antiinflamatórios e mineralocorticóide e meia-vida (Rang *et al.*, 2001).

Equivalências de Glicocorticóides					
Glicocorticóide	Dose Equivalente Aproximada (mg)	Potência Antiinflamatória Relativa	Potência Mineralocorticóide de Relativa	Meia-vida	
				Plasma (min)	Biológico (horas)
Ação curta					
Cortisona	25	0,8	2	30	8-12
Hidrocortisona	20	1	2	80-118	8-12
Ação intermediária					
Prednisona	5	4	1	60	18-36
Prednisolona	5	4	1	115-212	18-36
Triamcinolona	4	5	0	+200	18-36
Metilprednisolona	4	5	0	78-188	18-36
Ação longa					
Parametasona	2	10	0	+300	36-54
Dexametasona	0,75	25-30	0	110-210	36-54
Betametasona	0,6 – 0,75	25	0	+300	36-54

Segundo Gardi *et al.*, 1963; Vitali & Gardi, 1972; Yip & Li, 1979; Bundgaard & Hansen, 1981; Anderson & Taphouse, 1981 e Yip *et al.*, 1983, os 17- α monoésteres corticoesteróides são instáveis e na presença de ácido ou base, podem sofrer um rearranjo e formar os 21-monoésteres. Adicionalmente, segundo (Mckenzie & Atkinson, 1964) a forma 17-valerato de betametasona é muitas vezes mais ativa do que seu 21-isômero.

3.2 CICLODEXTRINAS E COMPLEXOS DE INCLUSÃO

3.2.1 Estrutura molecular e complexação

Ciclodextrinas ou cicloamiloses (Fig.4) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4, obtidas a partir da degradação enzimática do amido. As CDs mais conhecidas são as α , β e γ -CDs, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, adotando a conformação de cadeira. Do ponto de vista estrutural, as CDs apresentam-se na forma de “cones truncados” com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3, e a face mais estreita constituída pelas hidroxilas primárias ligadas em C6. A dimensão da cavidade é determinada pelo número de unidades de glicose constituintes da CD. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e os átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 determinam o caráter hidrofóbico do interior da cavidade das CDs (devido à alta densidade de elétrons livres, adquirindo características de uma base de Lewis). A presença de hidroxilas livres na parte externa das CDs confere a essas moléculas um caráter hidrofílico.

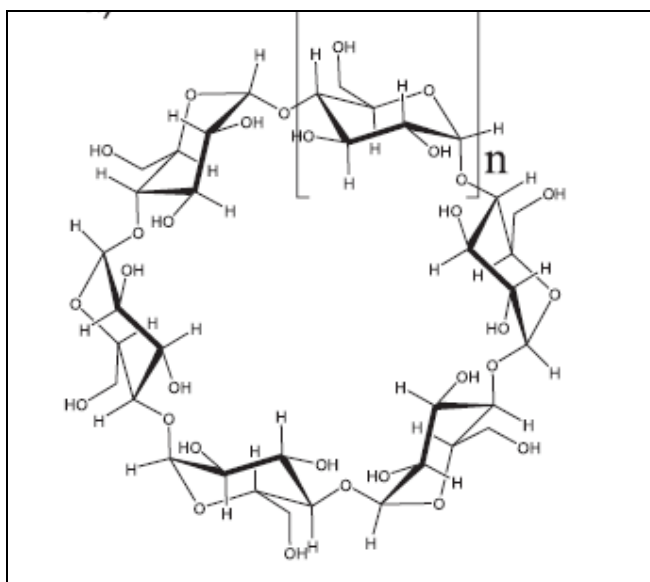


Figura 4 – Estrutura molecular da ciclodextrina (Britto *et al.*, 2004).

As CDs são as moléculas mais utilizadas na formação de complexos de inclusão do tipo hóspede/hospedeiro. Seu uso expande-se nas áreas: farmacêutica, alimentícia, cosmética, agroquímica e de higiene.

Durante a formação de complexos, uma molécula inteira ou parte dela fica complexada à CD, dependendo das características lipofílicas da molécula, lipofilicidade da cavidade do derivado de CD utilizado, além do tamanho da cavidade da CD.

Apesar de não haver formação de ligações covalentes neste processo, acredita-se ser a liberação de água de alta entalpia da cavidade a força principal envolvida na formação do complexo, visto suas ligações não satisfazerem de hidrogênio da mesma forma que na solução externa. As ligações envolvidas neste processo são: forças de Van der Waals, ligações (pontes) de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Fig.5).

As duas forças principais que regem o processo de inclusão da molécula na CD são a força de repulsão entre moléculas de água inclusas e a cavidade apolar da CD, e entre a água no meio (método de complexo em fase líquida) e a molécula hóspede apolar.

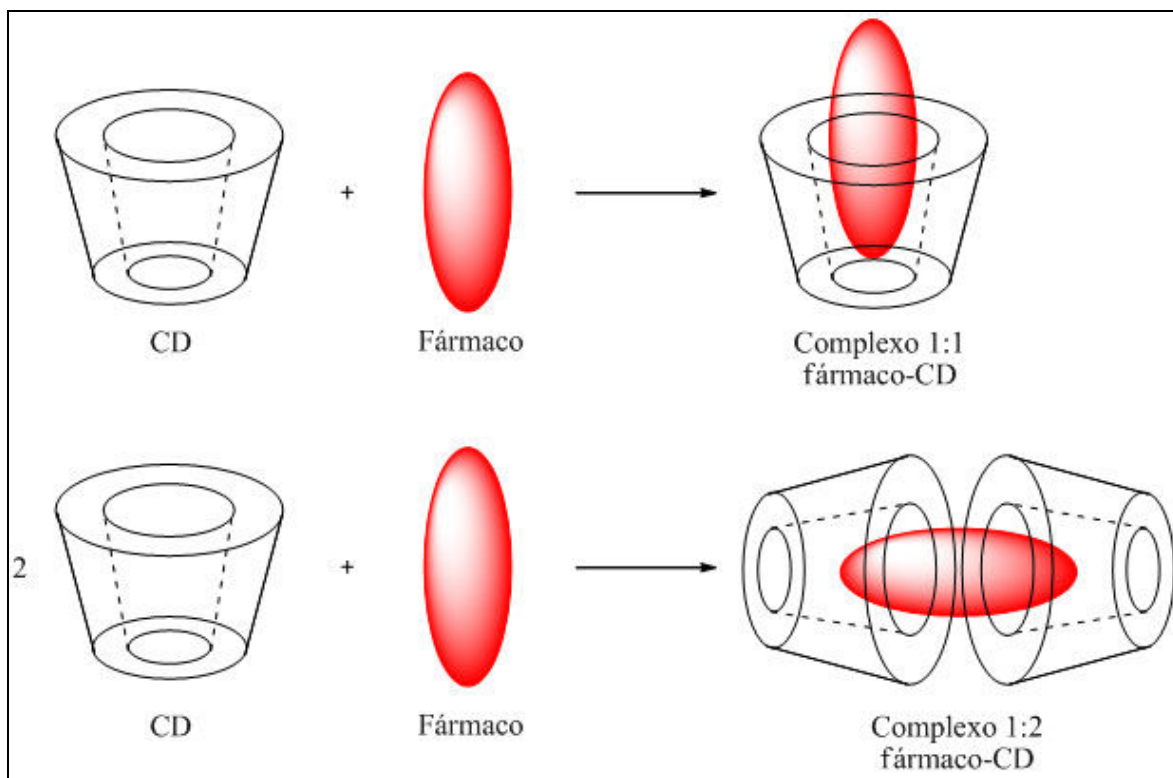


Figura 5 – Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão fármaco-CD.

(Disponível

em

http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/imagens/resenha_ciclod/img3.jpg.

Acessado em 20.jul.2010)

As moléculas de CD são relativamente grandes (peso molecular em torno de 1000 a mais de 2000), com uma superfície externa hidratada, e sob condições normais, estas moléculas irão permear membranas biológicas com dificuldade. Entretanto, determinadas condições, tais como coadministração de um auxiliar de penetração lipofílica e uso de oclusões a CD é capaz de penetrar a pele e transpor esta barreira. Alguns derivados hidrofóbicos da CD são capazes de modificar a barreira, extraindo seus componentes como colesterol e triglicerídeos. Na maioria dos casos, entretanto, os efeitos da CD na pele tem apenas uma pequena influência no transporte do PA até e através da pele. Concluindo, as CDs agem, na verdade, como verdadeiros carreadores permitindo a permanência de fármacos hidrofóbicos em solução e liberando-os para a superfície da pele.

3.2.2 Usos e vantagens das ciclodextrinas

Os complexos de CD podem apresentar as seguintes vantagens, na área farmacêutica:

- Compostos líquidos podem ser transformados em cristais, mais adequado para a produção de comprimidos;
- Diminuição de higroscopicidade de fármacos;
- Eliminação de sabores adstringentes e efeitos irritantes por contato direto do fármaco com as mucosas orais;
- Estabilização de compostos voláteis contra perda por evaporação ou mesmo devido a maus odores;
- Transporte através de obstáculos biológicos;
- Aumento da estabilidade química de fármacos (principalmente por oxidação e polimerização);
- Melhora na solubilidade de fármacos em meios aquosos, permitindo o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

A consequência primária da complexação de fármacos com CDs é o aumento na razão de dissolução e limite de solubilidade resultando em um melhoramento significativo e acelerado na biodisponibilidade. Na prática, uma redução no T_{max} e aumento medicamentos apresentados na tabela 2.

Menos de 10% das CDs e seus derivados produzidos são consumidas pela indústria farmacêutica, sendo seus maiores consumidores a indústria alimentícia e cosmética.

Em produtos cosméticos, as CDs são utilizadas para a solubilização e estabilização de componentes sensíveis, estabilização de emulsões, melhorar a absorção de princípios ativos através da pele, reduzir ou eliminar os maus odores de certos componentes, e reduzir a perda de princípios ativos através de volatilização, oxidação rápida, fotodegradação, entre outros.

As CDs estão presentes no mercado em formulações farmacêuticas diversas em países como Japão, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Alemanha, Itália, França, Bélgica, Holanda, Suíça, Suécia, Dinamarca, Islândia, Espanha, Portugal, entre outros. Estes produtos possuem uma boa aceitação, por muitas vezes solucionam limitações do fármaco dentro de determinada formulação, possuindo um grande potencial como excipientes nas diferentes formas farmacêuticas (Szejtli,2004)..

Existem numerosas formulações farmacêuticas que contêm complexos fármaco-CD (Tabela 2), em mercados de respeito como os Estados Unidos, Japão e Europa, demonstrando sua viabilidade comercial inegável. Além disso, estudos clínicos envolvendo medicamentos contendo complexos de inclusão fármaco-CD estão em andamento, e em um futuro próximo o número de formulações contendo CDs será francamente superior (Mosher & Thompson, 2002).

Tabela 2 – Usos comerciais de ciclodextrinas em medicamentos (Szejtli, 2004).

Fármaco/CD	Nome comercial	Indicação	Forma farmacêutica	Empresa/País
PGE ₁ / αCD	Prostvasin	Doença arterial oclusiva crônica e disfunção erétil	Injeção intraarterial	Ono, Japão
	Edex		Injeção intracavernosa	Schwarz, Alemanha
	Prostandin 500	Hipotensão controlada (uso cirúrgico)	Infusão	Ono, Japão
Óleo de alho / βCD	Xund	Antiarteroclerótica	drágea	Bipharm, Alemanha
	Tegra			Hermes, Alemanha
	Allidex			Pharmafontana, Hungria
	Garlessence			CTD, EUA
Istroconazol / HPβCD	Sporanox	Candidiase esofágial	Solução	Janssen, Bélgica
Nicotina / βCD	Nicorette	Combate ao tabagismo	comprimido sublingual	Pharmacia Upjohn,
	Nicogum		goma de mascar	Pierre Fabre, França
Dextrometorfano / βCD	Rynathisol	Antitussígeno	Solução	Synthelabo, Itália
Cetirizina / βCD	Cetirizin	Antialérgico	Solução	Losan Pharma, Itália

Respeitando-se o fato de que cada vez é mais freqüente se deparar com problemas de solubilização de novas entidades químicas que se encontram em desenvolvimento, é previsível que futuramente as CDs sejam utilizadas como ferramentas valiosas na otimização e façam parte de novos sistemas terapêuticos destes potenciais fármacos problemáticos. Assim como, na solução de problemas de estabilidade do fármaco, e demais vantagens proporcionadas pelo uso de CDs. Fármacos que foram descartados no passado, devido a problemas de veiculação em formulações e formas farmacêuticas adequadas, estudados no passado, poderão ser novamente estudados com o auxílio da complexação com CDs. Não podendo se deixar de lado o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e processos de fabricação onde pode ser viável a complexação com CDs (Veiga *et al.*, 2006).

No nível de regulamentação européia, americana e japonesa, o único princípio ativo, como tal, é o fármaco livre em produtos contendo complexos de inclusão fármaco-CD. Esta afirmação baseia-se no fato dos complexos de inclusão se dissociam com relativa facilidade uma vez diluídas em meios biológicos, sendo somente o fármaco livre absorvido para a corrente sanguínea. Assim, nestes países, o fármaco é aprovado para comercialização como uma formulação contendo CDs, e não como uma entidade fármaco-CD. A patenteabilidade só é aceita quando as reivindicações protejam as respectivas CDs, em caso de um novo derivado de CDs desenvolvido, ou a vantagem de utilização de uma CD em determinada formulação, mantendo-se a base de inovação (Veiga *et al.*, 2006).

Atualmente, as CDs naturais α -CD, β -CD e γ -CD não se encontram protegidas por patentes, estando disponíveis comercialmente por uma variedade de produtores. Já a utilização de alguns derivados de CDs, com é o caso da SBE- β -CD e HP- β -CD encontram-se protegidas por patentes, porém tal proteção não constitui um impedimento para sua utilização no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (Veiga *et al.*, 2006).

As CDs a nível regulamentar encontram-se presentes em monografias na farmacopéia americana e europeia desde 1995 e 1997, respectivamente. Adicionalmente, outras monografias podem ser encontradas como é o caso do Handbook of Pharmaceutical Excipients desde 1994 (Nash, 1996).

A eficácia clínica dos corticoesteróides depende da extensão de absorção percutânea ou penetração através do estrato córneo e epiderme. Fatores que influenciam a absorção incluem: princípio ativo de escolha, concentração do fármaco, veículo utilizado, sítio de aplicação, oclusão ou não da área, e integridade da barreira cutânea.

Não existe uma metodologia universal para a preparação de complexos de CD. A metodologia deve ser voltada especialmente ao princípio ativo de escolha, e o mesmo é válido para os requerimentos de escala laboratorial ou produção em larga escala industrial.

Os complexos de CDs podem ser preparados em solução e suspensão por fusão ou malaxagem. A técnica deve ser selecionada de acordo com as características físico-químicas da molécula incluída na CD (molécula hospedeira).

Um fármaco com coeficiente de solubilidade menor que o da CD, quando incluso, pode ter sua taxa de dissolução aumentada e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. O aumento da biodisponibilidade pode levar a uma diminuição da dose administrada com a mesma possibilidade de atividade biológica (Loftsson & Brewster, 2007).

3.2.3 Toxicologia

Durante o período de exploração das CDs, entre 1936 e 1970, em trabalho publicado por French informações errôneas sobre a toxicidade das CDs foram introduzidas. Esse estudo consistia na substituição de parte da dieta de carboidratos

de ratos por β -dextrinas, que se negavam a comer exceto em quantidades pequenas, e dentro de uma semana todos os ratos vieram a óbito. O exame *post-mortem* não revelou a causa. Nenhum estudo foi publicado em relação à análise da CD ministrada, e dados fundamentais do estudo em relação a metodologia do estudo não foram detalhados. A partir daí, estudos similares que inseriam CDs à dieta de ratos, em quantidades muito maiores, foram realizados nunca sendo observado o óbito destes animais devido a ingestão de CDs. Levando a crer que impurezas de solventes orgânicos estariam presentes na CD utilizada por French (Szejtli, 2004).

Estudos subseqüentes mostraram que a administração oral de doses elevadas de CDs não provoca a morte de animais. Isso pode ser observado em diversos estudos anteriores (Szejtli, 2004).

A ausência de toxicidade foi também verificada com a α -CD e β -CD, quando estes foram introduzidos em uma quantidade equivalente a 20% na dieta de ratos e cães (Antisperger, 1992).

Resumindo, diversos estudos de toxicidade demonstram que as CDs administradas por via oral são praticamente atóxicas, conseqüência da limitada ou nula absorção gastrointestinal ou através das membranas biológicas lipofílicas, devido a natureza hidrofílica e elevado tamanho. (Irie & Uekama, 1997, Thompson, 1997, Hirayama & Uekama, 1999).

Estudos de teratogenicidade e mutagenicidade também foram conduzidos em ratos, ficando provado que não existem efeitos nocivos desenvolvidos pela β -CD (Szejtli & Sebestyén, 1979). Os mesmos resultados foram obtidos com ratos e coelhos quando administrado α -CD e β -CD (Antisperger, 1992).

Em relação à toxicidade parenteral das CDs, a α -CD e β -CD devem ser utilizadas em concentrações limitadas, uma vez que sinais de intoxicação são evidenciados em ratos após administração pela via intravenosa, caracterizados por

nefrotoxicidade, sendo observadas alterações das células epiteliais a nível do túbulo proximal renal. (Frank *et al.*, 1976). Em elevadas quantidades, pela via intraperitoneal e intravenosa, a β -CD resulta na toxicidade caracterizada pelo aumento dos níveis de azoto uréico no sangue, diminuição na velocidade de ganho de peso corporal, perda de peso do fígado, aumento drástico no peso renal em relação ao corpo e diminuição na atividade de várias enzimas relacionadas com a função renal, em ratos. (Hiasa *et al.*, 1981 *apud* Veiga *et al.*, 2006). Pela via intramuscular, seus efeitos tóxicos são ocasionados pela ulceração no local de administração, e no caso de coelhos em que se administrou 50mg/Kg durante 12 dias, observaram-se alterações nefrotóxicas irreversíveis (Veiga *et al.*, 2006).

Em contra partida, a γ -CD, devido provavelmente à sua elevada solubilidade aquosa, não apresenta nefrotoxicidade e é menos hemolítica do que as demais CDs naturais, podendo ser utilizada com segurança em formulações injetáveis como agente complexante de fármacos (Uekama & Irie, 1987).

Na administração de derivados de CDs pela via parenteral, diferentes toxicidades são apresentadas. Resumidamente, o uso de derivados de CDs metiladas está limitado às formas farmacêuticas de uso oral, e algumas tópicas e infusões desde que abaixo do limite de concentração hemolítica. No caso de derivados de CDs, em administração (Szetjli, 1987).

Os derivados de CDs hidroxietiladas e hidroxipropiladas apresentam ausência de toxicidade permitindo a sua utilização em preparações parenterais e outras para aplicação nas mucosas. A mesma ausência de toxicidade foi observada nos derivados SBE- β -CD, G₂- β -CD, e β -CD e γ -CD sulfatadas.

Devido aos resultados obtidos por French em 1957, os próximos 25 anos foram escassos de estudos desenvolvendo produtos contendo CDs para uso humano, gerando uma grande lacuna temporal de estudos das CDs. Além disso, o fato das CDs serem produzidas em escala laboratorial, como química fina, nesse período também auxiliaram.

Apesar de serem bem conhecidas nos anos 70, as CDs eram vistas apenas como curiosidades científicas disponíveis apenas como reagentes caras de química fina. Porém, no final do século XX, a tecnologia em CDs sofreu um desenvolvimento surpreendente, e essas eram produzidas e utilizadas em escala industrial em quantidades de 1000 toneladas. Duas das principais razões que levaram a esse desenvolvimento são que as CDs agora eram produtos semi-naturais, produzidos a partir de uma matéria-prima natural e renovável, o amido, por uma conversão enzimática relativamente simples, e a ainda por uma tecnologia a favor do meio ambiente. Isso fez com que seu valor caísse a valores aceitáveis pela indústria.

3.2.4 Derivados de ciclodextrinas

Além das formas básicas das CDs, existem os derivados de CDs modificados sinteticamente a fim de se melhorar a solubilidade da CD (e seus complexos), melhorar o acoplamento e/ou associação entre as CDs e suas moléculas hóspedes, ligar grupamentos específicos em sítios de ligação, ou formar polímeros e estruturas contendo CD imobilizadas insolúveis.

Dentre os milhares de derivados de CD descritos em artigos científicos e patentes, somente alguns podem ser levados em consideração a caráter de síntese em escala industrial e utilização. Isso porque muitos deles possuem reações de múltiplas etapas complicadas e purificações com rendimentos a nível laboratorial. Alguns exemplos desses derivados utilizados pela indústria são a metil β -CDs e 2-hidroxipropil β -CDs.

3.2.5 Desenvolvimento atual de trabalhos com ciclodextrinas

Nem todos os derivados de CD podem ser administrados em seres humanos, parte porque tais CDs possuem tal afinidade por membranas lipídicas celulares do organismo, que dependendo de sua concentração pode resultar em hemólise.

Aproximadamente 22% das publicações são dedicadas a estudos de inclusão com CDs, tratando de energia e cinética de inclusão, caracterização através das mas diferentes técnicas (e.g. raios-X, infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear e análise térmica), interação de CDs com moléculas hóspedes específicas, modelagem enzimática com CDs e seus derivados, preparação e análise de complexos de CDs e etc. Esses métodos, assim como a correlação entre a complexação e parâmetros externos e estruturais, formam a base de todas as aplicações práticas de CDs.

Tal qual o maior grupo de publicações refere-se a aplicações de CDs na área farmacêutica. A maior parte dos fármacos é pouco solúvel em água, assim sua absorção biológica é lenta e frequentemente distante de sua totalidade. Adicionalmente, muitos fármacos são parcialmente sensíveis a oxidação, decomposição térmica, luz, íons, outros compostos da formulação e etc. Grande parte dos fármacos é ideal para complexação com CDs graças a sua baixa polaridade, massa molecular, e estrutura que permitem sua complexação no interior da cavidade das CDs.

Esse é um campo bastante produtivo, e considerando o crescente desenvolvimento e estritos requerimentos para a aprovação de uma nova entidade química (um complexo com CD de um fármaco bem conhecido é sempre considerado uma nova entidade química) deve ser considerada como um grande alcance que mais de doze fármacos foram aprovados e são comercializados na forma de complexos de CDs. Em contra partida, o grande número de publicações e patentes relacionados a complexos de inclusão fármaco/CD (mais de 5000) é um engano, pois muitos autores publicam os mesmos resultados em diferentes revistas

científicas, sob diferentes títulos, mas com idêntico conteúdo. Frequentemente é possível verificar redescobertas publicadas, simplesmente porque os autores não leram as literaturas originais, inclusive por grandes laboratórios. Como foi o caso em que três empresas reportaram estudos da interação espirolactona/CD, apesar de vários estudos terem sido publicados 15 anos antes (Szejtli, 2004).

Segundo Szejtli, 2004, apesar de trabalhos importantes serem publicados atualmente a respeito de CDs, muitos deles possuem um erro em comum. O objeto desses trabalhos já foi publicado há 15 - 25 anos atrás, e essas novas publicações não citam as mais antigas. Justamente, o período em que as CDs não passavam de “meras” curiosidades científicas. Isso faz com que essas publicações pareçam inovadoras.

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é definida como um procedimento pelo qual solutos são separados por um processo de migração dinâmica diferencial em um sistema que consiste de duas fases, uma estacionária, composta por sítios ativos em que o soluto interage por adsorção, partição, troca iônica, formação de pares iônicos, interações hidrofóbicas, separação quiral ou exclusão por tamanho. E outra fase, móvel, em que o soluto é transportado continuamente por um fluxo constante, e possui mobilidades diferentes devido a sua interação com a fase estacionária (Collins, 2006).

Através desta técnica é possível identificar e quantificar substâncias através metodologias analíticas.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação baseada em uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida. Compostos a serem analisados são dissolvidas em um solvente adequado, e a maior parte das separações é realizada à temperatura ambiente. Assim, a maior parte dos princípios

ativos não voláteis ou termicamente instáveis, podem ser cromatografados sem decomposição ou necessidade de formar derivados voláteis.

Os módulos que fazem parte do cromatógrafo líquido de alta eficiência são: bomba quaternária, injetor, forno, detector e degaseificador.

Dentre os diferentes detectores para a cromatografia líquida de alta eficiência, os detectores de DAD (detector de arranjo de diodos), merecem destaque por serem amplamente utilizados no desenvolvimento de metodologias analíticas. Estes detectores possuem a habilidade de medir absorvâncias de múltiplos comprimentos de onda simultaneamente na totalidade da faixa do ultravioleta-vísivel. Isso ocorre, pois a luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, e os comprimentos de onda resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos. Assim, todo o espectro pode ser armazenado.

Dentre as principais vantagens desta técnica estão: a possibilidade de obtenção de espectros tridimensionais, mostrando absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção, o conhecimento do espectro de absorvância da molécula permitindo selecionar o comprimento de onda de máxima absorvância, melhorando a detectabilidade e eliminação de picos interferentes, e determinação da pureza do pico cromatográfico através da razão da absorvância entre dois comprimentos de onda, sendo essa razão constante sobre toda largura de um pico conclui-se que o pico é puro.

A técnica de CLAE é amplamente utilizada para a avaliação da eficiência de inclusão de complexos com CDs, citada em diversos trabalhos (Flood *et al.*, 2000 e Kim *et al.*, 2010).

Apesar de ter sido criada essencialmente com uma técnica de separação, passou a ocupar um lugar de destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa nas mais diversas aplicações e áreas, contando com um enorme número de publicações.

3.4 ANÁLISES TÉRMICAS

Grupo de técnicas nas quais propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidos em função da temperatura enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (Wendlandt, 1986). As técnicas mais utilizadas são: análise térmica diferencial (DTA), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). Estas são técnicas amplamente utilizadas na ciência farmacêutica para a caracterização de fármacos sólidos e excipientes, há mais de 30 anos. É possível, através de tais técnicas, coletar informações sobre incompatibilidades químicas ou físicas potenciais entre um PA e os tão conhecidos excipientes “inertes” (Mura *et al.*, 1998; Venkataram *et al.*, 1995; Lotter *et al.*, 1997; Gomes-Pinho *et al.*, 1998). Informações adicionais relacionando os efeitos de armazenagem a elevadas temperaturas, também podem ser obtidas. Estas reações podem ou não levar a inativação do fármaco em uma formulação.

A técnica DSC envolve a aplicação de um sinal de aquecimento e/ou resfriamento para uma amostra e uma referência. Quando a amostra sofre um evento térmico, a diferença no fluxo de aquecimento para uma amostra (em um cadinho) e uma referência (também em um cadinho) é monitorada contra o tempo ou temperatura, enquanto a temperatura é programada em uma atmosfera específica. Essa atmosfera pode comumente ser composta por: ar sintético, ar ambiente, nitrogênio ou argônio. Conseqüentemente, a temperatura e energia associadas aos eventos, tais como fusão, reações de redução e oxidação, transição vítrea, ebulição, sublimação, decomposição, cristalização ou transição gel para cristal líquido, podem ser avaliadas.

A técnica TG determina mudanças na massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. Em DTG, a derivação da mudança de massa em relação ao tempo, dm/dt , é gravado em função do tempo (t) ou temperatura (T). Em outros

casos, a derivação da mudança de massa em relação à temperatura, dm/dT , é gravado, em função do tempo ou temperatura. Em ambos os casos, a curva resultante é a 1ª derivada da curva TG, fornecendo uma série de picos, ao invés de uma curva com etapas. Um platô horizontal na curva TG, fornece um platô horizontal correspondente na curva DTG, devido ao $dm/dt = 0$. Uma máxima na curva DTG é obtida quando a curva TG possui um ponto de inflexão, onde a massa foi perdida mais rapidamente. Segundo Araújo *et al.*, 2003, a pequena quantidade de amostras utilizada, rápidas leituras para estudos de estabilidade em sólidos, e informações sobre propriedades químicas e físicas fazem das técnicas termoanalíticas ferramentas importantes para o desenvolvimento de compostos farmacêuticos.

A equação de Arrhenius descreve a cinética de um sistema durante uma mudança química. O efeito da temperatura neste sistema é introduzido a partir da equação de Arrhenius:

$$K(t) = A \exp^{-E_a/RT}$$

Onde,

A – Fator pré-exponencial ou fator de frequência

E_a – Energia de ativação aparente

R – Constante geral dos gases

T – Temperatura absoluta

Derivando a equação acima tem-se:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp^{-E_a/RT} f(\alpha)$$

O método isotérmico termogravimétrico, associado à equação de Arrhenius (acima), é comumente utilizado para acompanhar a cinética de uma reação de decomposição no estado sólido: são traçados vários gráficos de fração decomposta (α) versus tempo (t), mantendo constantes as temperaturas (T) na região de interesse, para uma faixa definida de perda de massa (Fernandes *et al.*, 1999; Rodante *et al.*, 2002 e Cides *et al.*, 2006).

3.5 INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia por infravermelho compreende a seção do espectro eletromagnético entre os números de ondas de $4000 - 400\text{cm}^{-1}$. Esta técnica não só fornece identificações únicas para a qual cada molécula, mas também identifica grupamentos funcionais independentemente da molécula a que pertencem. É uma técnica rápida, e com o mínimo ou nenhuma preparação de amostra necessária, para a caracterização e elucidação de estrutura molecular, na qual as moléculas ou grupamentos funcionais vibram (deformação angular ou estiramento) quando absorvem a radiação do infravermelho em determinado número de onda (Silverstein *et al.*, 2006).

A radiação infravermelha causa o aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos. A absorção por uma molécula orgânica de energia infravermelha é dependente dos tipos de ligações e de átomos presentes nos grupos funcionais desta molécula (Solomons & Fryhle, 2001).

Apesar de cada molécula apresentar um espectro de infravermelho único, exceto moléculas enântioméricas, certo grupo de átomos originam bandas que ocorrem aproximadamente na mesma frequência, independentemente da estrutura

da molécula. A identificação/caracterização de amostras baseia-se nessas bandas características de grupos.

A radiação infravermelha na faixa entre 10000 e 100cm^{-1} converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O espectro vibracional é expresso com uma série de bandas, pois cada mudança de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos.

A intensidade das bandas pode ser expressa como transmitância (T) ou absorvância (A). A transmitância é expressa como a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorvância, é o logaritmo decimal do inverso da transmitância, i.e.:

$$A = \log (1/T).$$

As vibrações moleculares são classificadas como deformações axiais e deformações angulares. A vibração de deformação axial é caracterizada por movimentos rítmicos ao longo do eixo da ligação fazendo com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. A frequência desta deformação esta intimamente relacionada às massas dos átomos ligados (quanto maior o peso menor a frequência) e a rigidez relativa da ligação (as ligações mais rígidas vibram em frequência maior).

A vibração de deformação angular é caracterizada por variações ritmadas de ligações que possuem um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem alterar as posições relativas dos átomos do grupo. E somente as vibrações que geram alterações rítmicas do momento de dipolo da molécula são observadas no infravermelho convencional.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier tem como princípio que a radiação contendo todos os comprimentos de onda de interesse é separada em dois feixes. Um deles permanece fixo e o outro, espelho móvel, se move. Fazendo-se variar as distâncias percorridas pelos dois feixes, obtêm-se uma sequência de interferências construtivas e destrutivas, que geram variações na intensidade de radiação recebida pelo detector (interferograma). A transformação de Fourier converte o interferograma, que está no domínio do tempo, para o domínio de frequências gerando o espectro de infravermelho.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier possui várias vantagens frente à espectroscopia de infravermelho convencional. Algumas vantagens são que não são utilizados monocromadores, sendo a totalidade da faixa de radiação utilizada simultaneamente sobre a amostra, com ganho de tempo, permitindo resoluções extremamente altas ($\leq 0,001\text{cm}^{-1}$). Além disso, existe a facilidade de manipulação dos dados devido à conversão analógico-digital, e os resultados de várias varreduras é combinado para diminuir o ruído.

Para avaliação da formação de complexos de inclusão, esta técnica pode ser limitante uma vez que é dependente de que as bandas provenientes da CD não interfiram nas bandas de grupamentos funcionais do PA. Além disso, exige que o PA esteja em quantidade proporcional ao de CD para que estas bandas possam ser visíveis (Uekama & Otagiri, 1987 *apud* Veiga *et al.*, 2006).

3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Técnica em que um campo magnético é aplicado, e os núcleos estruturais da molécula absorvem radiação eletromagnética. Estas absorções resultam em picos em determinadas frequências (campos protegidos ou desprotegidos) contra suas intensidades. Estes campos protegidos e desprotegidos são determinados pelo deslocamento químico da nuvem eletrônica dos átomos de hidrogênio ou carbono,

dependendo do tipo de RMN, nas interações intramoleculares. Seu campo magnético é gerado por supercondutores resfriados com hélio e operam no modo de pulsação de campo magnético com transformadas de Fourier. (Silverstein *et al.*, 2006).

Os núcleos de certos elementos e isótopos se comportam como se fossem magnetos girando ao redor de um eixo, o hidrogênio simples (^1H) e carbono-13 (^{13}C) apresentam esta propriedade. Quando compostos contendo esses núcleos são submetidos a um forte campo magnético, gerado por magnetos supercondutores, e, simultaneamente, uma energia eletromagnética (região de radiofrequência) de pulso curto é irradiada, excitando os núcleos todos de uma só vez os núcleos do composto podem absorver a energia através de um processo denominado ressonância magnética, sendo detectado como uma voltagem na prova sensora do RMN, seu sinal amplificado e produzindo um espectro característico para o composto. Essa absorção ocorre somente quando a força do campo magnético e a frequência da radiação eletromagnética estão em valores específicos.

O instrumento acumula diversas varreduras dos dados incorporando-os, minimizando os ruídos eletrônicos, ressaltando os sinais reais obtidos de RMN. Os instrumentos com transformada de Fourier possuem resolução e sensibilidade aumentadas quando comparados a espectrômetros de RMN por varredura.

Os núcleos (prótons) possuem como característica absorverem energia em forças de campo magnético diferentes, pois em determinada molécula os núcleos de hidrogênio estão em regiões de maior ou menor densidade eletrônica, assim deslocamentos químicos distintos serão sinalizados no espectro de RMN. Esses deslocamentos químicos são medidos na escala horizontal do espectro de RMN, nomeada escala delta (δ) em unidades de parte por milhão.

O composto tetrametilsilano (TMS) muitas vezes é utilizado em análises de RMN para calibrar a escala de deslocamento químico do espectro, já que seu deslocamento químico é de δ 0.

Outra característica dos espectros de ^1H RMN é o fenômeno de desdobramento de sinal que resulta das influências magnéticas dos hidrogênios ligados aos átomos adjacentes aos hidrogênios responsáveis pelo sinal, sendo esta uma informação importante na interpretação de espectros de RMN para elucidação estrutural de moléculas.

O RMN de hidrogênio, (^1H -RMN), é especialmente utilizado na caracterização, e na avaliação de estequiometria e geometria de complexação, em complexos de inclusão utilizando CDs. A técnica tornou-se o método mais avançado e importante na caracterização de complexos fármaco-CD, por ser um método direto que permite distinguir interações superficiais ou inclusão do fármaco no interior da CD, caracterizando então um complexo de inclusão. (Djedaini *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1998).

Através da técnica de ^1H -RMN é possível monitorar os deslocamentos químicos para campos mais ou menos protegidos do espectro, inferindo a formação do complexo de inclusão devido a variações na composição das moléculas. Essas alterações podem ser verificadas principalmente nos hidrogênios localizados no interior das moléculas de CD (H3 e H5), conforme Figura 6, deslocando-se para campos mais altos (protegidos). Em contrapartida, os hidrogênios localizados em sua face externa (H1, H2 e H4) sofrem desvios mínimos ou nenhum desvio, por não fazerem parte do processo de complexação. (Szejtli, 1988).

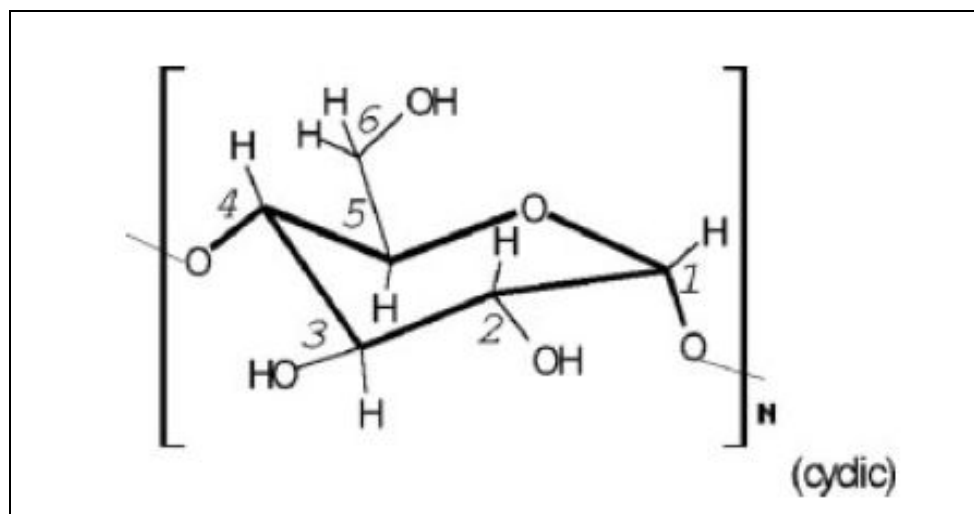


Figura 6 – Unidade de α -D-(+)-glicopirranose, com numeração dos átomos. N = 6 a 8 (Bratu *et al.*, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-Primas, Padrões de Referência e Reagentes

O princípio ativo 17-valerato de betametasona foi adquirido pelos Laboratórios Stiefel Ltda., dos fabricantes SM Biomed e Symbiotica (ambos da Malásia). Assim como seu padrão de referência da USP e produto de degradação 21-valerato de betametasona (United States Pharmacopeia, 2010).

As CDs foram cedidas pelos fabricantes Sigma-Aldrich e Wacker Chemie AG. São elas: β -CD e γ -CD (Wacker Chemie AG) e Metil- β -CD (Sigma-Aldrich).

Os solventes utilizados na preparação e análises são: éter etílico (Quimex), ácido acético glacial grau HPLC (J.T.Baker), metanol grau HPLC (J.T.Baker), acetonitrila (J.T.Baker) e água purificada (Milli-Q).

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção da CD

O método de solubilidade de fases é amplamente utilizado, pois dentre as propriedades das moléculas hóspedes que se pretende alterar, a solubilidade é a mudança mais evidente. Portanto, o método de solubilidade de fases, proposto por Higuchi & Connors em 1965, é simples quando comparado a outros métodos para determinação da formação de complexos de inclusão em solução, como as técnicas de ressonância magnética nuclear, infravermelho e difração de raios-X.

Seu fundamento baseia-se no monitoramento das alterações de solubilidade da molécula hóspede frente ao agente complexante (CD), que é adicionado em quantidade crescente. Assim, a molécula hóspede é adicionada em excesso em um volume determinado de solvente, e quantidades crescentes de CD são adicionadas a diferentes soluções em excesso da molécula hóspede (quantidades equivalentes entre eles). As suspensões resultantes são submetidas à agitação até que o equilíbrio termodinâmico seja atingido, correspondente ao máximo de solubilidade da molécula hóspede em determinado meio. Este equilíbrio pode durar alguns minutos a várias horas dependendo das características físico-químicas da molécula hóspede e derivado da CD, estas características são: o tamanho da cavidade da CD, derivatização das CDs naturais, substituição molar dos derivados das CDs e solubilidade intrínseca do fármaco.

Após equilíbrio, a suspensão é filtrada através de papel de filtro quantitativo, o filtrado então é quantitativamente avaliado através de técnicas como CLAE, UV-Vis ou outra técnica adequada. Desta forma, é possível determinar as variações de solubilidade da molécula hóspede, de acordo com a concentração desta molécula em solução após filtragem, em função da concentração de CD adicionada ao meio, graficamente conhecido como diagrama de fases.

A classificação destes diagramas de fases permite determinar a estequiometria envolvendo na complexação e a constante de estabilidade (K_c).

Estes diagramas são divididos basicamente em dois tipos, A e B, e seus subtipos A_P , A_L e A_N , e B_S e B_I , respectivamente (Fig.7). Os diagramas do tipo A correspondem a formação de complexos solúveis, na proporção do aumento da concentração de CD um aumento de solubilidade da molécula hóspede é esperado. O subtipo A_L , linear: à medida que aumentamos a concentração de CD maior a solubilidade da molécula hóspede, i.e, segue ordem 1. No subtipo A_P , representado graficamente como uma curvatura positiva, temos a formação de complexo de ordem 2 ou superior em relação a CD e de ordem 1 em relação à molécula hóspede. Por fim, o subtipo A_N , não comum, e característico de auto-agregação dos complexos em solução ou elevadas concentrações de CD no meio causando alterações na natureza do solvente.

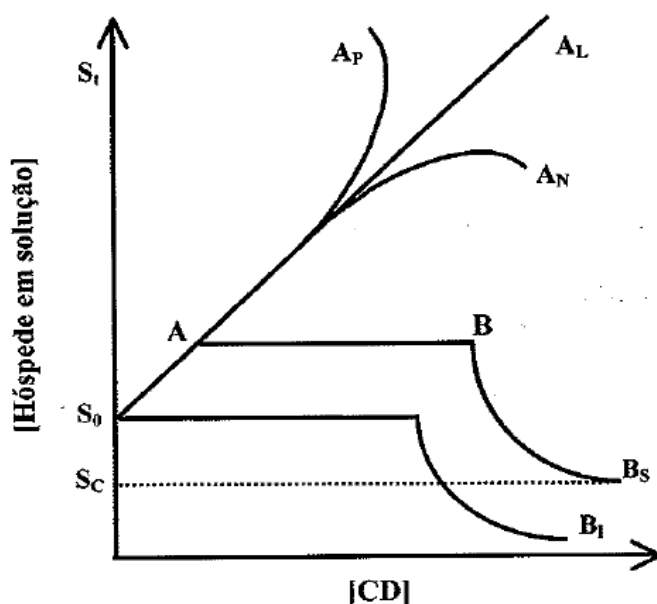


Figura 7 – Representação dos diagramas de solubilidade de fases. B_S , B_I , A_L , A_P e A_N . S_0 , S_l e S_c correspondem, respectivamente, a solubilidade da molécula hóspede na ausência de CD em equilíbrio, a concentração em equilíbrio da molécula hóspede solubilizada (livre e complexada) e o limite de solubilidade do complexo formado (Veiga *et al.*, 2006).

Os diagramas do tipo B correspondem à formação de complexos insolúveis ou de solubilidade limitada. O subtipo B_S , é caracterizado por um aumento de solubilidade da molécula hóspede à medida que se adiciona CD, porém após este aumento seu platô de solubilidade é atingido e inicia-se um processo em que todo o fármaco sólido foi consumido.

A adição de mais fármaco resulta na sua depleção para a solução, por formação do complexo e concomitante precipitação do complexo insolúvel originando uma diminuição da molécula hóspede para um valor de solubilidade constante correspondente ao composto de inclusão. No subtipo B_I , um processo semelhante ao do subtipo B_S ocorre, com o diferencial de o complexo formado ser tão insolúvel que o aumento inicial da concentração de fármaco não é detectável.

Tendo por base o método proposto foram preparadas, em triplicata, misturas contendo um excesso do princípio ativo para diferentes concentrações de CD, conforme tabela 3.

Tabela 3 – Razões molares utilizadas de VB e diferentes tipos de ciclodextrinas, para o teste de solubilidade de fases.

Derivado de CD	Razão molar (CD : princípio ativo)
Metil- β -CD	0,25 : 1
	0,5 : 1
	1 : 1
	1,5 : 1
	2 : 1
β -CD	0,25 : 1
	0,5 : 1
	1 : 1
	1,5 : 1
	2 : 1
γ -CD	0,25 : 1
	0,5 : 1
	1 : 1
	1,5 : 1
	2 : 1

Essas misturas foram preparadas em erlenmeyer, contendo 50mL de água purificada e agitadas magneticamente por um período de 24h à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), para se atingir o equilíbrio termodinâmico. Após este período, as suspensões obtidas foram filtradas através de filtro quantitativo e a solução resultante (filtrado) analisado através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para se dosear o princípio ativo presente nessa solução, correspondente à porção de princípio ativo que interagiu com a CD presente, modificando sua solubilidade.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise em cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada nos Laboratórios Stiefel Ltda., utilizando o equipamento modelo HP1100 da Agilent Technologies.



Figura 8 – Sistema de CLAE com detector de DAD Agilent/HP 1100 series.

(Disponível em <http://www.gentechscientific.com/agilenthp-1100-series-hplc-system-with-dad/>.ccs.ufrj.br/imagens/resenha_ciclod/img3.jpg. Acesso em 23.jul.2010).

A metodologia analítica empregada foi baseada na metodologia proposta na Farmacopéia americana USP32-NF 27, teor de valerato de betametasona (Betamethasone valerate, Assay).

O estudo foi conduzido com detector DAD com varredura espectral de 195 à 350nm, e detecção em 254nm, fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C, volume de injeção de 10µL, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5µm (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].

Foi utilizado solução diluente [Ácido acético glacial : Metanol (0,1% : 99,9%)], na solubilização das soluções padrão e amostra. Estas últimas em uma concentração de aproximadamente 0,1mg/mL.

4.2.3 Obtenção dos complexos

Os métodos utilizados na obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido de CDs variam de acordo com as características físico-químicas da molécula hóspede e CD, além disso, fatores como aplicabilidade industrial, tempo, equipamentos e materiais a serem utilizados são determinantes nesta escolha. Obviamente otimizações podem ser realizadas nos métodos, de acordo com a necessidade apresentada por cada combinação, não existindo um método único e ideal (Thompson, 1997).

Os métodos de preparação de complexos de inclusão com CDs são divididos em preparações em fase líquida, semi-sólida e sólida.

Os métodos selecionados foram: malaxagem e coevaporação. Essas escolhas foram definidas devido à facilidade de preparação dos complexos de inclusão, fácil aplicação industrial e o uso de equipamentos específicos ser desnecessário.

A malaxagem caracteriza-se por ser um método de preparação em fase semi-sólida, aplicável a moléculas hóspedes que possuem como característica a baixa solubilidade em água. É um processo bastante utilizado devido a sua facilidade, ser rápido, processar-se em baixas temperaturas (ideal para compostos termolábeis e

voláteis), com utilização mínima de água (evitando a hidrólise de algumas substâncias), e ter aplicabilidade industrial podendo ser processado em larga escala. Porém, como contra este método produz complexos de baixa cristalinidade (Veiga *et al.*, 2006).

Seu processamento consiste na adição da molécula hóspede (podendo ser essa previamente dissolvida em etanol) a uma pasta aquosa de CD. Após maceração da mistura, o produto obtido é seco, e em seguida adiciona-se uma pequena quantidade de éter ou etanol (selecionando-se o de maior afinidade pela molécula hóspede) sobre papel de filtro quantitativo contendo o complexo de inclusão formado, removendo a molécula hóspede não complexada.

Neste projeto, a maceração foi realizada por um período de uma hora, e após, foi realizado uma secagem a 100°C prévia a filtração.

Já o método de coevaporação caracteriza-se por ser uma preparação em fase líquida, e seu processamento consiste na preparação de uma mistura de molécula hóspede e CD em quantidades estequiométricas. Assim, a molécula hóspede é adicionada lentamente sob agitação magnética contínua a uma solução contendo a CD em sua totalidade. Após agitação magnética, durante determinado período de tempo e temperatura a mistura é filtrada em filtro quantitativo e a solução resultante evaporada até a sua total secagem.

Neste projeto, utilizou-se uma agitação magnética em uma velocidade entre 500 a 800RPM e temperatura de 60°C, por um período de quatro horas.

Após seleção destes métodos, oito amostras contemplando variações no método de coevaporação foram utilizadas e uma amostra utilizando o método de malaxagem descrito em literatura, conforme tabela 4.

Tabela 4 – Descrição resumida das metodologias utilizadas no processo de formação dos complexos de inclusão, e códigos adotados para cada amostra.

Método de Coevaporação	
A	Conteúdo para 25mL de água purificada
B	Conteúdo para 50mL de água purificada
C	Conteúdo para 100mL de água purificada
D	Conteúdo para 50mL de água purificada, e posterior filtração com éter etílico
E	Conteúdo para 50mL de água purificada, uso de ultrassom substituindo a agitação magnética
F	Conteúdo para 50mL de água purificada, em proporção [Princípio ativo : CD (1:2)]
H	Conteúdo para 50mL de água purificada, e posterior filtração com éter etílico e agitação magnética por 72 horas
I	Conteúdo para 50mL de água purificada, e posterior filtração com éter etílico e agitação magnética por 72 horas

4.2.4 Análises térmicas

Os estudos termoanalíticos foram realizados nos Laboratórios Stiefel Ltda. utilizando-se os equipamentos de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Os estudos de comportamento térmico foram realizados, a partir da célula calorimétrica (modelo DSC Phoenix 204 F1, Netzsch, nos Laboratórios Stiefel Ltda.) com razão de aquecimento de 10°C/min., sob a atmosfera de N₂, para elucidar os compostos e compará-los em condição inerte.



Figura 9 – Equipamento de DSC 204 F1 Phoenix da Netzsch.

(Disponível em <http://www.e-thermal.com/tg209.htm>. Acesso em 23.jul.2010).

As curvas de TG do estudo isotérmico de decomposição foram obtidas através dos ensaios realizados em termobalança (modelo TG Iris 209 F1, Netzsch, nos Laboratórios Stiefel Ltda.). Os ensaios foram realizados sob a atmosfera de ar.



Figura 10 – TG 209 F1 Iris da Netzsch.

(Disponível em <http://www.e-thermal.com/tg209.htm>. Acesso em 23.jul.2010).

4.2.5 Infravermelho médio com transformada de Fourier

A leitura das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, modelo Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR System, e preparadas através do método de *mulling* em pastilhas de KBr, i.e., dispersão das amostras em óleo mineral (Nujol®) da Perkin-Elmer. A faixa espectral utilizada foi a de $7800 - 370\text{cm}^{-1}$, média de 6 varreduras, intervalo de $1,0\text{cm}^{-1}$ e resolução de $4,0\text{cm}^{-1}$.



Figura 11 –. Espectrofotômetro GX FT-IR da Perkin-Elmer.

(Disponível em <http://www.ncku.edu.tw/~rrmrc/instruments-cht.htm>. Acesso em 23.jul.2010).

4.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A técnica de ressonância magnética nuclear foi realizada através da leitura das amostras em espectrômetro de ressonância magnética nuclear, modelo Bruker DPX 300, campo de 7,0 Tesla e frequência 300MHz. As amostras foram preparadas solubilizando-se cerca de 10 mg da amostra em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado, e o composto tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência. A calibração da escala de deslocamento químico do espectro de RMN (de ^1H ou de ^{13}C) com o sinal do solvente residual não-deuterado pode ser influenciado pela concentração da amostra e pela temperatura da análise. O TMS foi inserido em tubo capilar fechado, e introduzido nos tubos contendo as amostras. A fim de se comparar os

deslocamentos químicos entre os complexos de inclusão e CD, as temperaturas de 25°C e 70°C foram estudadas. Foram avaliados os espectros de ^1H e ^{13}C RMN.



Figura 12 – Sistema de RMN de 300MHz da Bruker.

(Disponível em <http://www.chemistry.lsu.edu/.../item1414.html>. Acesso em 23.jul.2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início das experimentações foi realizado com o teste de solubilidade de fases, de acordo com o método proposto por Higuchi & Connors, 1965. Através deste método foi possível avaliar qual CD, dentre as estudadas, possui uma maior força de complexação com o fármaco. Além disso, foi avaliada a estequiometria da interação CD e fármaco para a formação do complexo de inclusão (CD-fármaco), promovendo um maior rendimento. Foram realizadas as misturas CD-fármaco, conforme o tabela 4. Essa avaliação foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme o método para determinação do princípio ativo 17-valerato de betametasona inscrito na farmacopéia americana USP32-NF 27, teor de valerato de betametasona (Betamethasone valerate, Assay).

Foi utilizado um detector de DAD, para avaliação da pureza cromatográfica do pico obtido para o princípio ativo, excluindo assim a integração ou soma de áreas de interferentes em sua determinação.

A curva de calibração foi construída com três concentrações diferentes de padrões analíticos, e uma correlação de 0,99998 foi obtida (Fig.13), os desvios padrões relativos do padrão analítico de referência encontram-se dentro do limite de 2,0% para a repetibilidade.

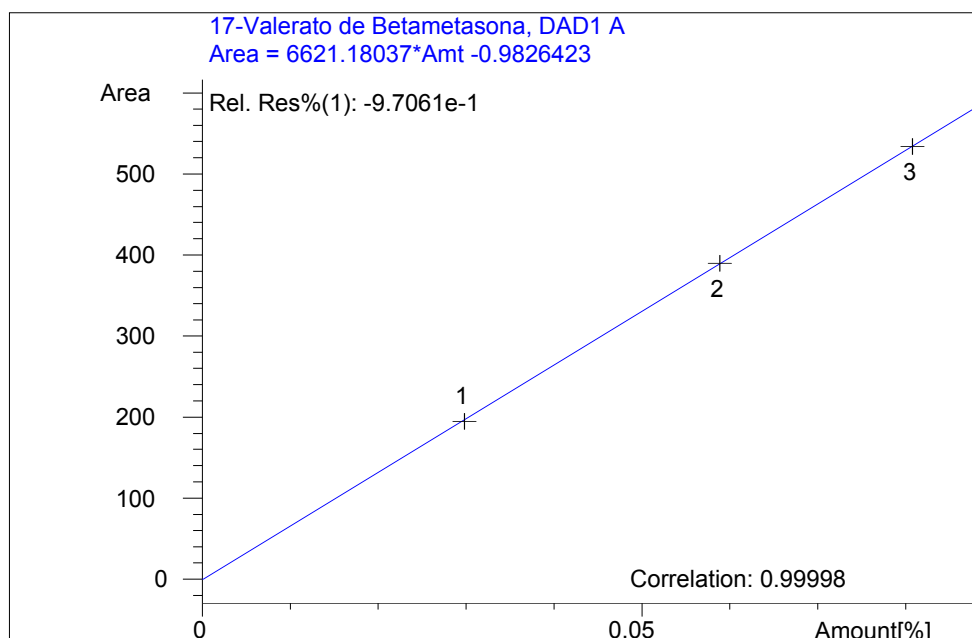


Figura 13 – Curva de calibração obtida pela técnica de CLAE, para determinação de 17-valerato de betametasona.

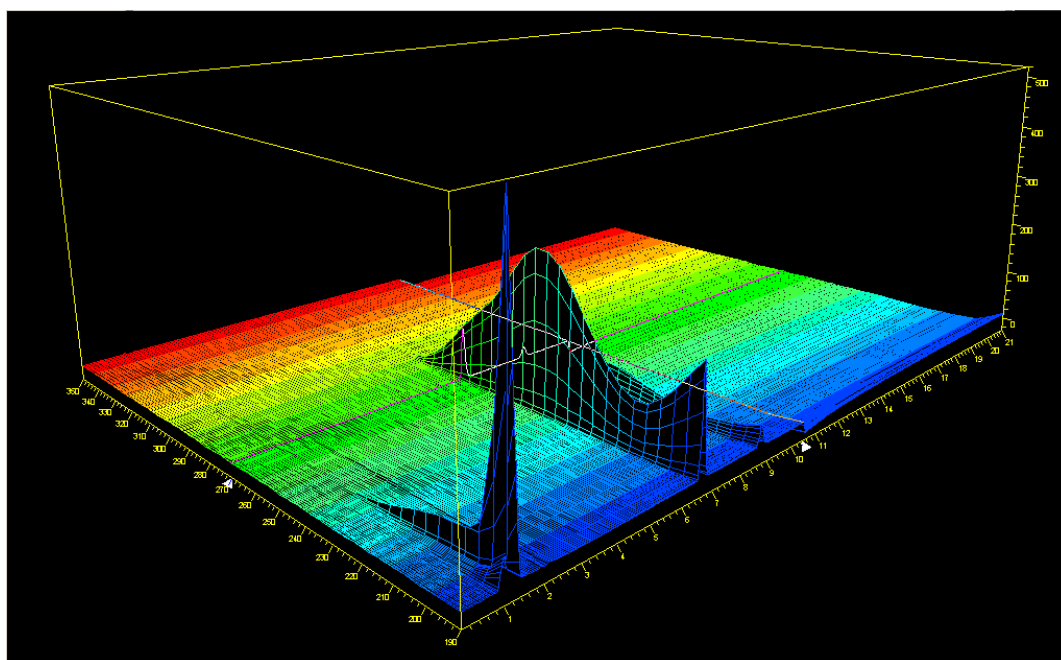


Figura 14 – Espectro cromatográfico em 3D, obtido em detector DAD. Mistura física princípio ativo e CD.

É possível observar na figura 14 , a ausência de interferentes no espectro cromatográfico em 3D obtido através de detector DAD. Nele podemos observar os 3 eixos (X, Y e Z) representando tempo (minutos), intensidades de absorvância [unidades de absorvâncias (AU)] e comprimento de ondas na região do UV (nanômetros). O tempo de retenção de aproximadamente 6,8 minutos, representa o pico do princípio ativo 17-valerato de betametasona, ausente de interferentes, com sua absorvância máxima em 240nm. É possível também observar a presença de um pico no tempo de retenção de aproximadamente 1,3 minutos representando o choque de solventes, da solução diluente e em aproximadamente 8,8 minutos o pico do isômero 21-valerato de betametasona presente como produto de degradação do princípio ativo.

Nas figuras 15, 16 e 17, podemos verificar os espectros cromatográficos das CDs (que não possuem absorção na região do UV), princípio ativo e, mistura física do princípio ativo e seu isômero 21-valerato de betametasona. Nesses espectros podemos verificar a ausência de interferências nas diferentes corridas cromatográficas para se determinar a concentração de princípio ativo nas soluções de fármaco-CD em diferentes razões.

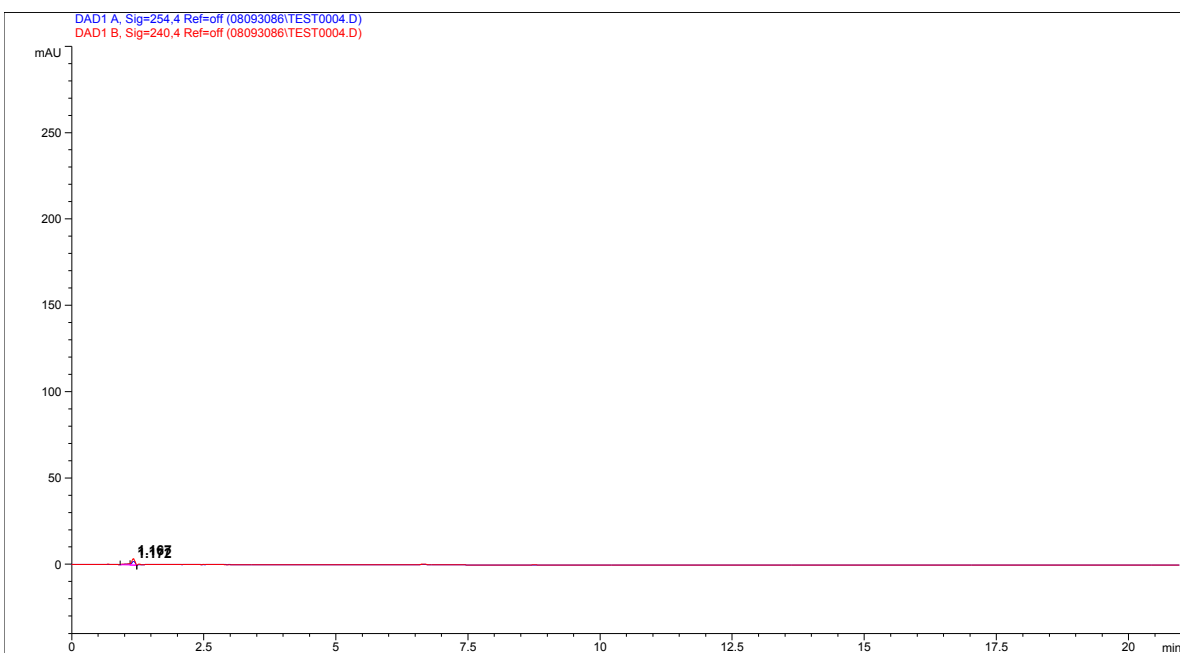


Figura 15 – Cromatografia nos comprimentos de onda de 254nm e 240nm. γ -ciclodextrina. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C, volume de injeção de 10 μ L, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5 μ m (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].

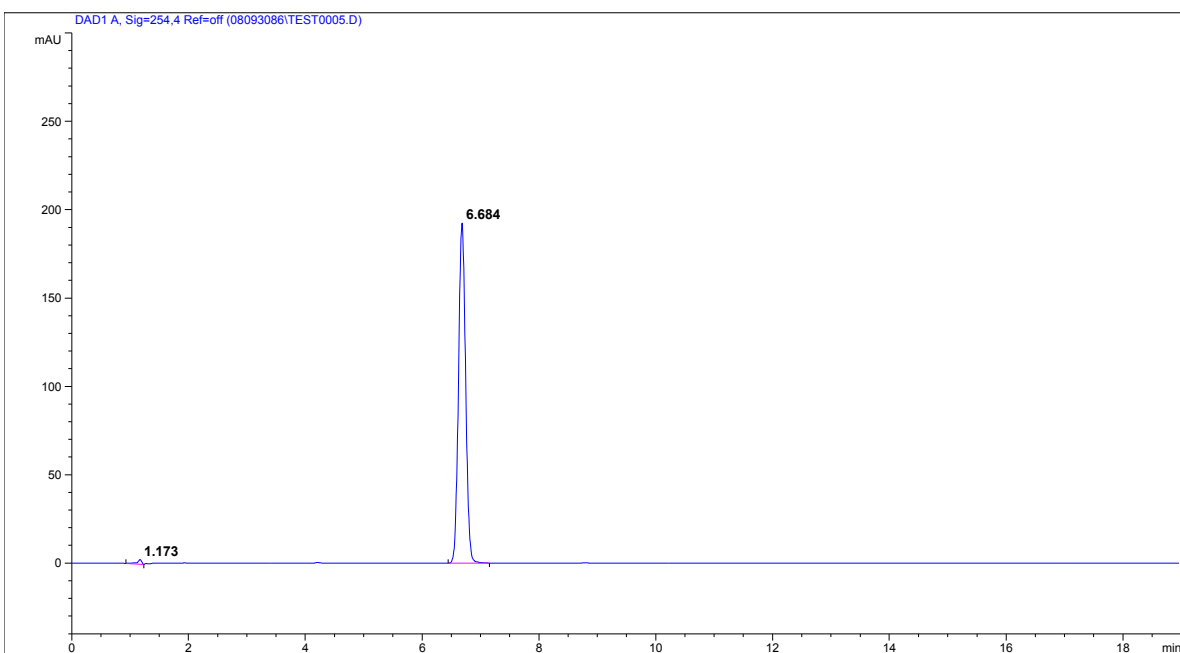


Figura 16 – Cromatografia no comprimento de onda de 254nm. 17-valerato de betametasona. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C, volume de injeção de 10µL, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5µm (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].

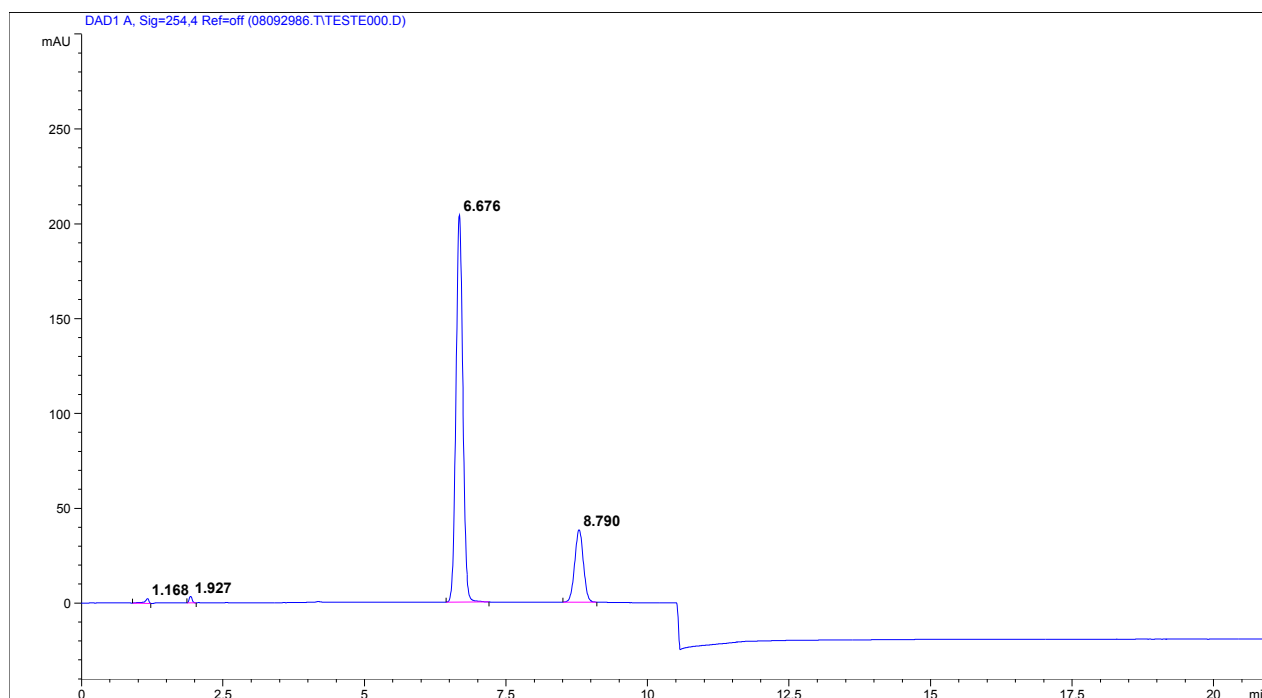


Figura 17 – Cromatografia no comprimento de onda de 254nm. 17-valerato de betametasona e 21-valerato de betametasona. Fluxo de 2,0mL/min., temperatura de coluna de 60°C , volume de injeção de 10µL, coluna cromatográfica Zorbax SB C18 5µm (250mm x 4,6mm), e fase móvel isocrática água purificada : acetonitrila [50:50 (v/v)].

Das três CDs avaliadas a γ -CD mostrou, em seu diagrama de solubilidade de fases (Fig.18), ser a mais efetiva na formação de um complexo de inclusão com o princípio ativo, visto que a concentração de princípio ativo encontrado na solução final após filtragem foi maior ao utilizar esta CD, com um aumento linear da formação do complexo do subtipo AI. Assim, a estequiometria proposta para o complexo 17-valerato de betametasona - γ -CD, é de 1:1.

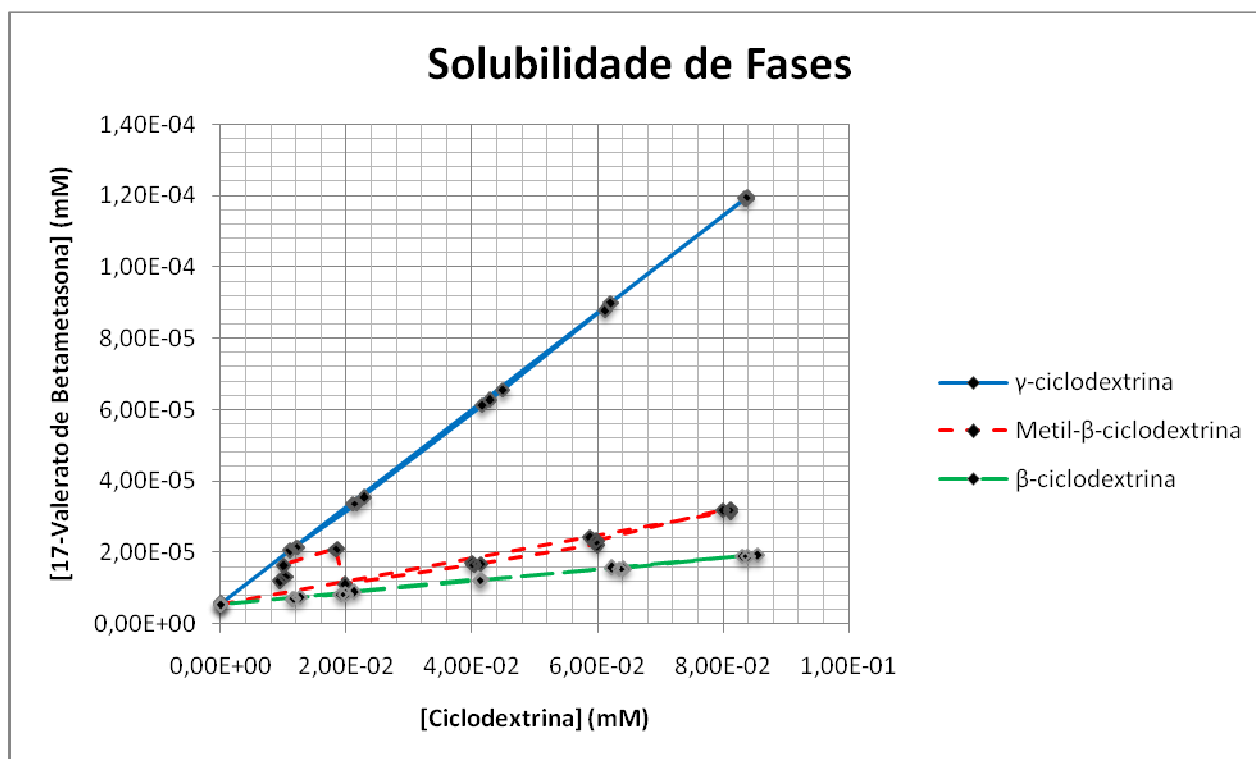


Figura 18 – Diagrama de solubilidade de fases das três CDs estudadas (γ -CD, metil- β -CD e β -CD) em diferentes razões de fármaco-CD.

Diferentes métodos de complexação foram testados, a fim de se determinar o método de maior aplicação industrial, i.e., minimizando a necessidade de aparatos específicos e dificuldades para a formação do complexo de inclusão. Os métodos testados foram: coevaporação (fase líquida) e malaxagem (fase semi-sólida), sendo que ambas tem como características formarem complexos sólidos e com alto rendimento.

O método de coevaporação visa preparar o complexo em quantidades estequiométricas, adicionando-se lentamente a molécula hóspede sob agitação magnética contínua a uma solução aquosa contendo CD, por um tempo predeterminado para a formação do complexo. Posteriormente a solução é evaporada até sua total secagem. Já o método de malaxagem consiste em adicionar a substância hóspede (sendo comum, estar previamente dissolvida em etanol) a

uma pasta aquosa de CD. Após malaxagem da mistura, o produto obtido é seco, podendo ser lavado com uma pequena quantidade de solvente (éter ou etanol), para remover a molécula hóspede não complexada. As amostras foram preparadas de acordo com o estabelecido na tabela 4.

Com o intuito de se caracterizar a formação do complexo de inclusão, algumas técnicas foram utilizadas para se determinar essa complexação. Inicialmente, as amostras preparadas foram identificadas por calorimetria exploratória diferencial, em comparação com a amostra de 17-valerato de betametasona (Fig.19), CD (Fig.20) e mistura física do princípio ativo e CD (Fig.21), até a temperatura referente ao evento endotérmico de fusão do princípio ativo, em ambiente inerte de Nitrogênio e em uma razão de 10°C/min. Nestas condições, caso ocorra a formação do complexo de inclusão utiliza-se como parâmetro avaliativo o desaparecimento do evento endotérmico de fusão do princípio ativo, devido à mudança de seu ponto de fusão, devido a complexação com a CD. Em todas as amostras estudadas observou-se o desaparecimento do evento endotérmico citado, portanto, indícios de que houve a formação do complexo de inclusão (Fig.22 e Fig.23) são evidentes.

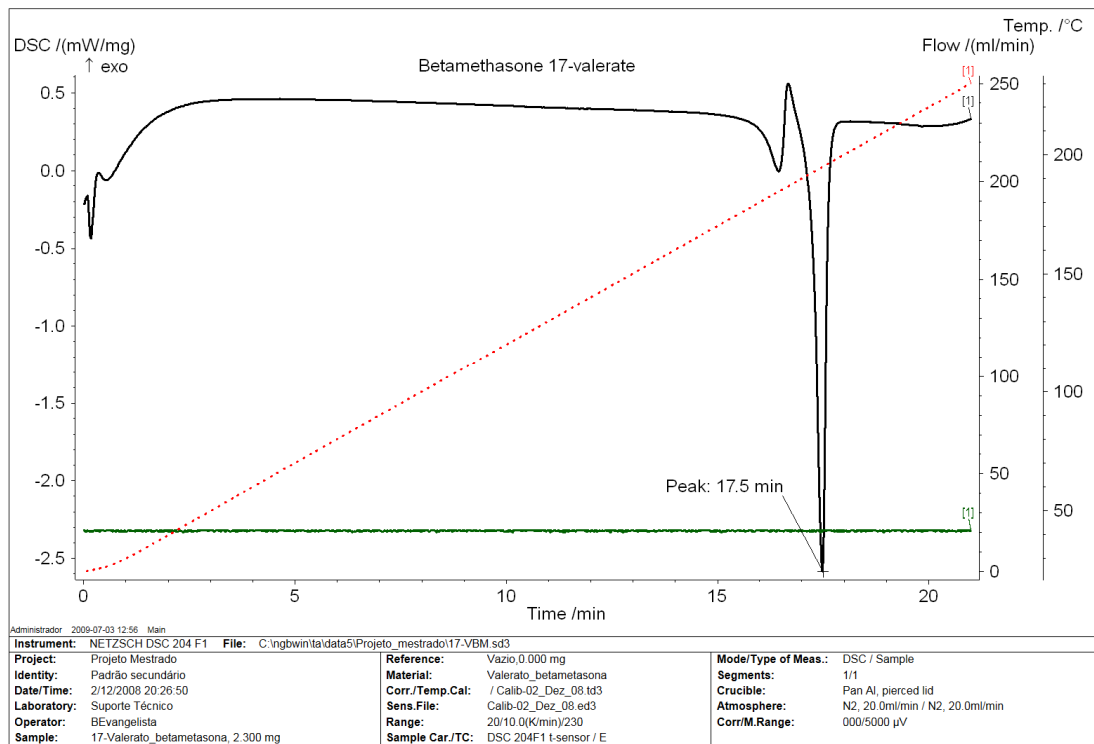


Figura 19 – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Evento endotérmico de fusão do princípio ativo 17-valerato de betametasona.

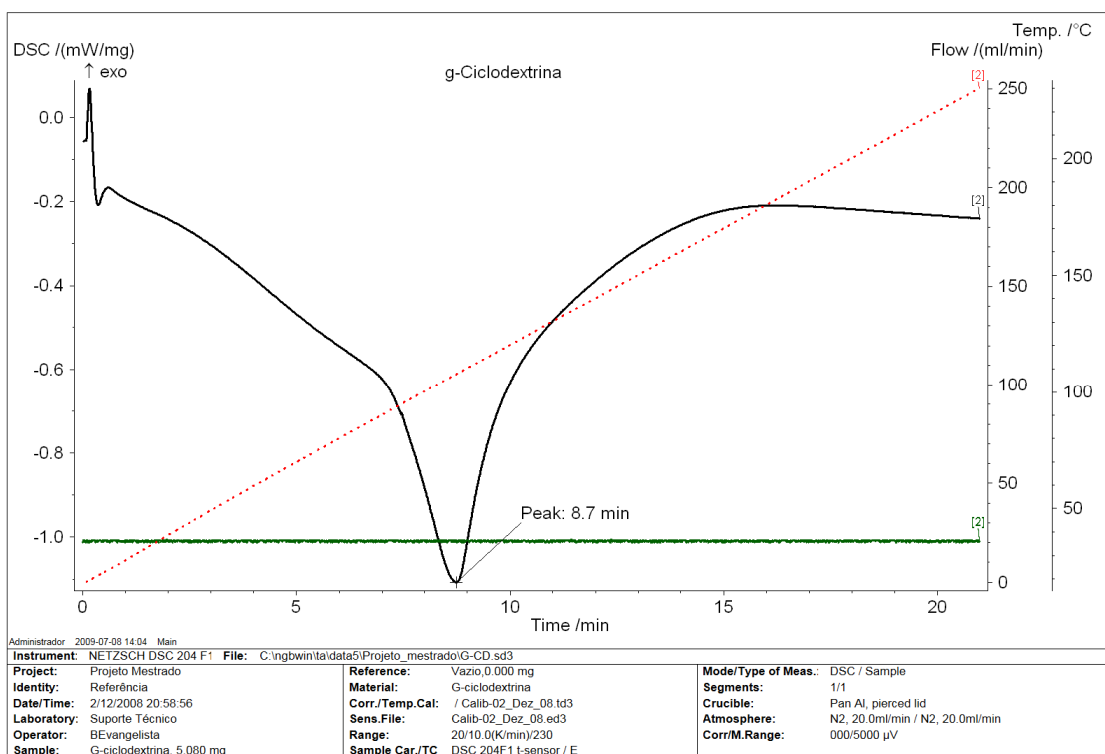


Figura 20 – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Evento endotérmico de fusão da γ -CD.

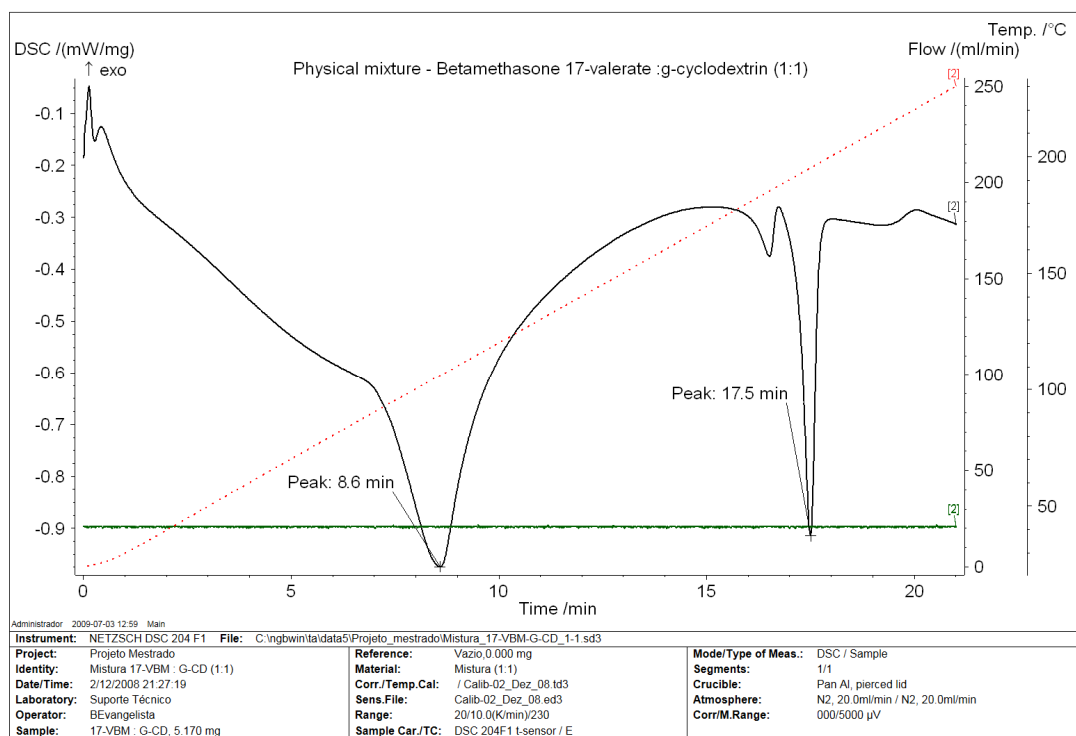


Figura 21 – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de aquecimento de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Eventos endotérmicos de fusão do PA e γ -CD, em mistura física (1:1).

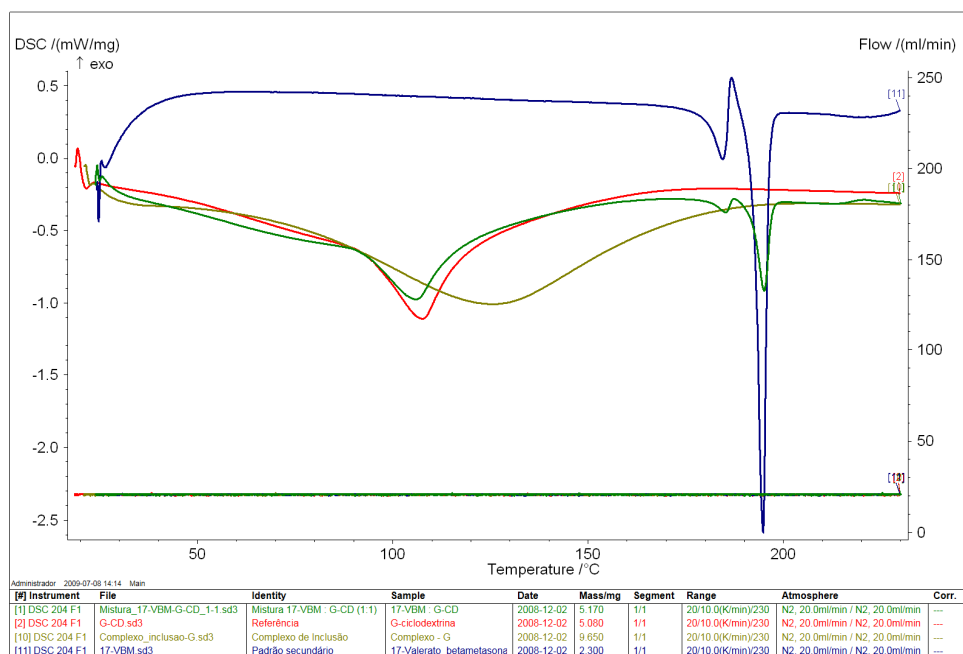


Figura 22 – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Amostras de referência de 17-valerato de betametasona (azul), γ -CD (vermelho), 17-valerato de betametasona e γ -CD em mistura (1:1) (verde) e complexo de inclusão G (bege).

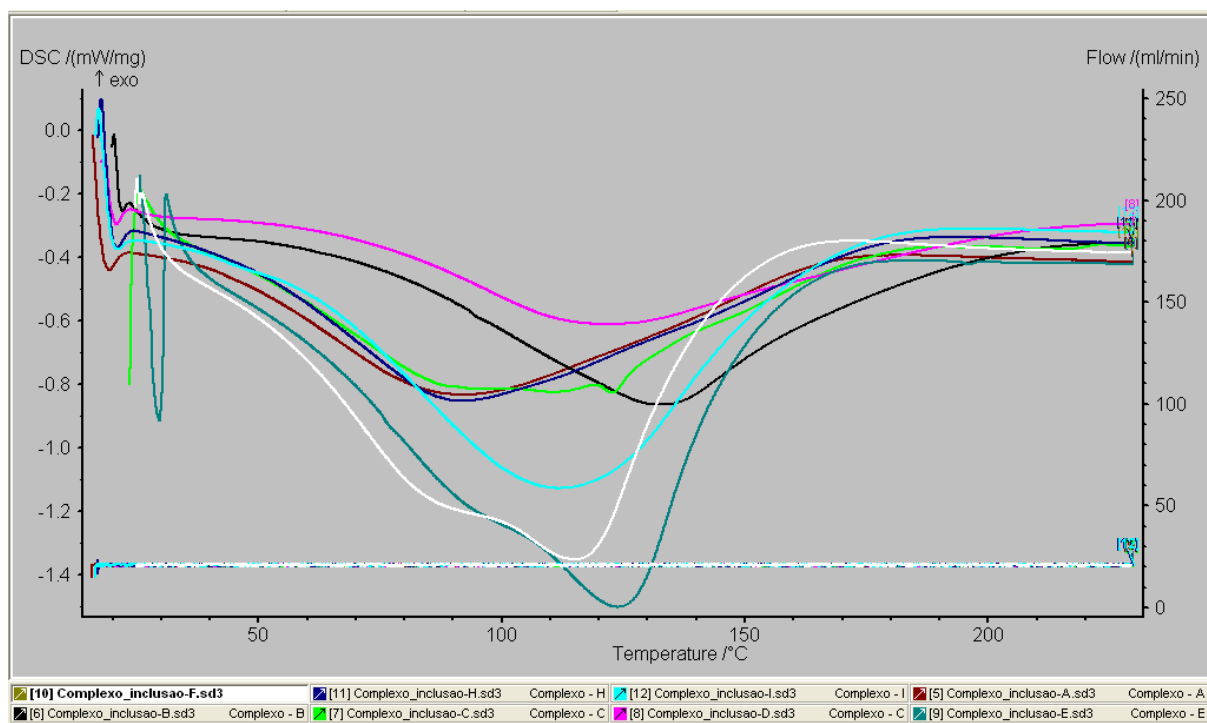


Figura 23 – Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, razão de 10°C/min. e ambiente de Nitrogênio de 20mL/min. Amostras A-I, e ausência de evento endotérmico de fusão à ~195°C.

Foi utilizado como teste complementar para a avaliação da formação do complexo de inclusão, o infravermelho com transformada de Fourier. Foram preparadas dispersões do complexo formado em óleo mineral, assim como do princípio ativo e CD para avaliação de possíveis diferenças nas bandas de absorção na faixa de comprimento de ondas do infravermelho médio que confirmassem os resultados obtidos com a análise térmica. Nessa avaliação mudanças nas bandas de absorção das amostras em comparação àqueles observadas no princípio ativo, CD e mistura física foram observados.

O princípio ativo 17-valerato de betametasona possui grupamentos funcionais cetônicos característico no espectro de infravermelho.

Os grupamentos cetônicos caracterizam-se por uma banda intensa entre 1870cm^{-1} e 1540cm^{-1} , que tem como origem a deformação axial da ligação C=O. É uma banda de fácil reconhecimento por não apresentar variações de posição e ser relativamente livre de interferentes. Adicionalmente, as cetonas apresentam absorção moderadamente intensa entre 1300cm^{-1} e 1100cm^{-1} , devido a vibrações de deformação axial e angular de C-C-C do grupo C-C(=O)-C. Esta absorção pode consistir de bandas múltiplas.

A avaliação dos resultados obtidos na análise dos diferentes complexos de inclusão manipulados (princípio ativo, γ -CD e mistura física na razão 1:1) evidenciou diferenças significativas nos n° de onda de aproximadamente 1728, 1660, 1617 e 1608 (Fig.24). Estas regiões são características de estiramento da carbonila de grupos cetônicos, permitindo-nos assim supor posições da complexação da CD com o fármaco (20-cetona, 3-cetona e/ou Δ 1,4-dieno), devido ao desaparecimento destas bandas. Este desaparecimento não ocorre com a mistura física 1:1 que funcionou como um controle para o experimento, e foi analisada nas mesmas condições e concentração das demais amostras estudadas, incluindo os complexos de inclusão.

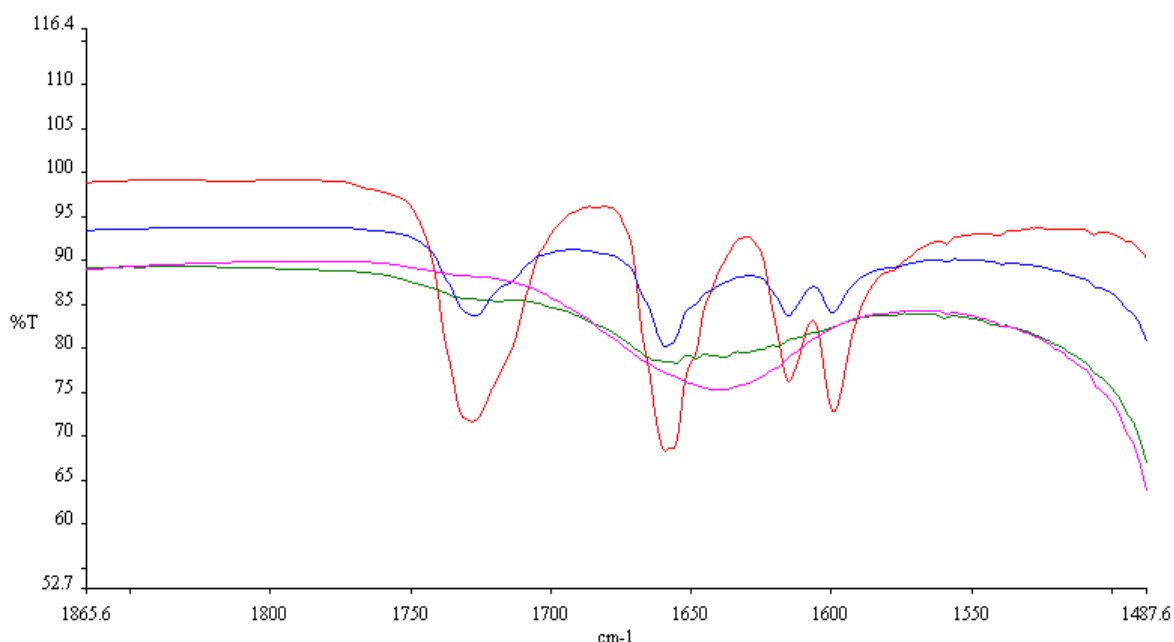


Figura 24 – Espectro de infravermelho médio com transformada de Fourier, em 17-valerato de betametasona (vermelho), mistura física (1:1) (azul), complexo de inclusão G (verde) e γ -CD (rosa). Faixa espectral de $7800 - 370\text{cm}^{-1}$, intervalo de $1,0\text{cm}^{-1}$ e resolução de $4,0\text{cm}^{-1}$, disperso em óleo mineral.

Nas bandas características dos estiramentos dos grupamentos O-H em 3300cm^{-1} , C-O do éster do prolongamento valerato em 1189cm^{-1} e C-O da hidroxila-11 em 1068cm^{-1} , não ocorreram variações. Levando-nos a crer que a complexação não ocorre nos sítios de ligação desses grupamentos funcionais.

Foi utilizado um terceiro método para evidenciar a formação do complexo de inclusão, a técnica de ressonância magnética nuclear. Nesta técnica é avaliada a diferença no deslocamento químico ($\Delta\delta$ ppm) dos picos de H da CD entre o complexo de inclusão e a γ -CD (Fig.25-28). Uma diferença acima da sensibilidade do equipamento caracteriza a formação do complexo de inclusão. Foi utilizado o DMSO deuterado (d6) como solvente para os dois compostos de inclusão estudados. O composto tetrametilsilano (TMS) utilizado como referência para os deslocamentos químicos já que apresenta deslocamento químico de 0 (δ 0).

O TMS foi preparado em um pequeno tubo e inserido internamente ao tubo contendo a solução amostra, não permitindo assim interações entre os complexos de inclusão formados e o TMS. Dessa forma, foi possível encontrar deslocamentos químicos dos sinais de H da γ -CD, conforme tabelas 5-8 obtidos a partir das figuras 25 a 28. Duas temperaturas foram estudadas 25°C e 70°C, esta última possibilitou uma maior visualização dos deslocamentos químicos por melhor separar os picos característicos.

Tabela 5 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão A, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 70°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.

^1H RMN - 70°C			
Pico	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	γ-CD	Complexo A	
Aprox. 5,8ppm	5,789	5,756	-0,033
	5,781	5,747	-0,034
Aprox. 5,7ppm	5,723	5,688	-0,035
	5,699	5,665	-0,034
Aprox. 5,1ppm	5,169	5,136	-0,033
	5,157	5,124	-0,033
Aprox. 4,5ppm	4,515	4,484	-0,031
	4,497	4,465	-0,032
	4,479	4,447	-0,032
Aprox. 3,9ppm	3,929	3,900	-0,029
	3,908	3,876	-0,032
	3,862	N/D	N/A
	3,839	N/D	N/A
	3,863	3,830	-0,033
	3,851	3,816	-0,035
	3,793	N/D	N/A
Aprox. 3,6ppm	3,818	3,783	-0,035
	3,658	3,623	-0,035
	3,626	3,603	-0,023
	N/D	3,597	N/A
	3,611	3,592	-0,019

	3,581	3,580	-0,001
--	-------	-------	--------

Tabela 6 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão A, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 25°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.

^1H RMN - 25°C			
Pico	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	γ-CD	Complexo A	
Aprox. 5,9ppm	N/D	6,123	N/A
	6,114	6,082	-0,032
	6,089	6,055	-0,034
Aprox. 5,0ppm	5,224	5,189	-0,035
	5,213	5,182	-0,031
Aprox. 4,6ppm	4,899	4,868	-0,031
	4,880	4,850	-0,030
	4,862	4,832	-0,030
Aprox. 3,7ppm	3,961	3,926	-0,035
	3,892	3,857	-0,035
	3,847	3,814	-0,033
Aprox. 3,4ppm	3,691	3,689	-0,002
	3,647	N/D	N/A
	3,649	3,616	-0,033
	3,612	3,583	-0,029

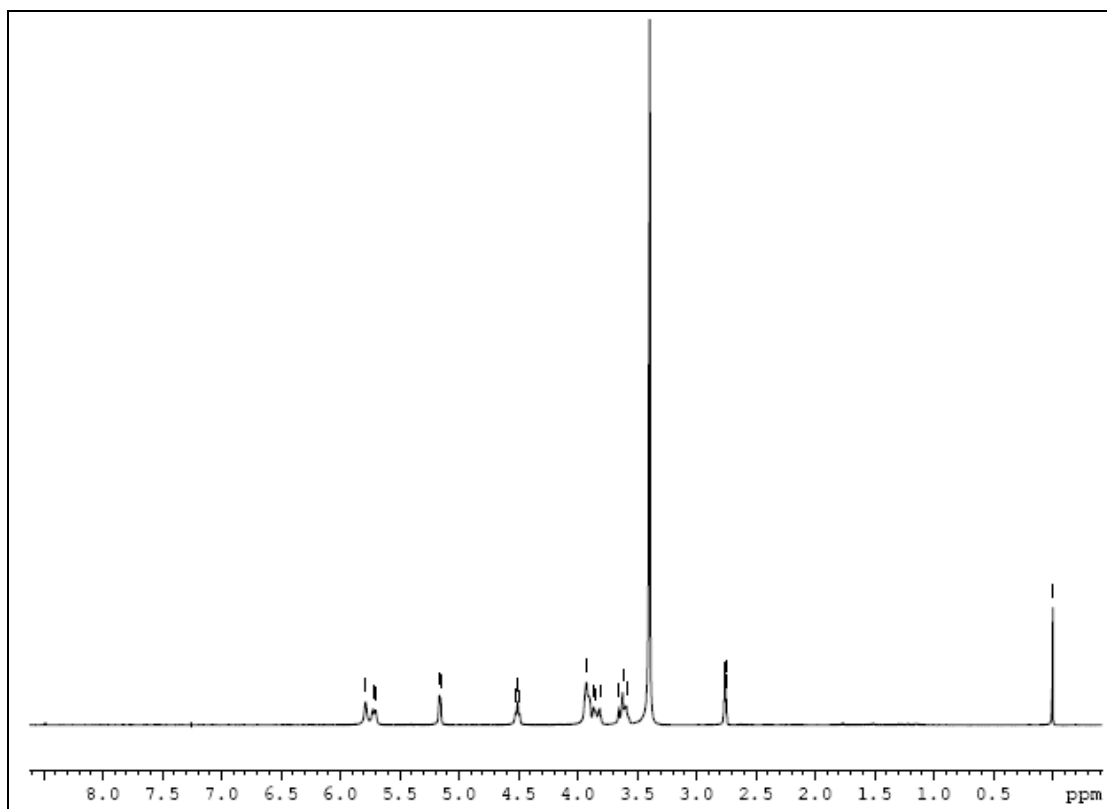


Figura 25 – Ressonância magnética nuclear em γ -CD. ^1H RMN, 300MHz, em DMSO.

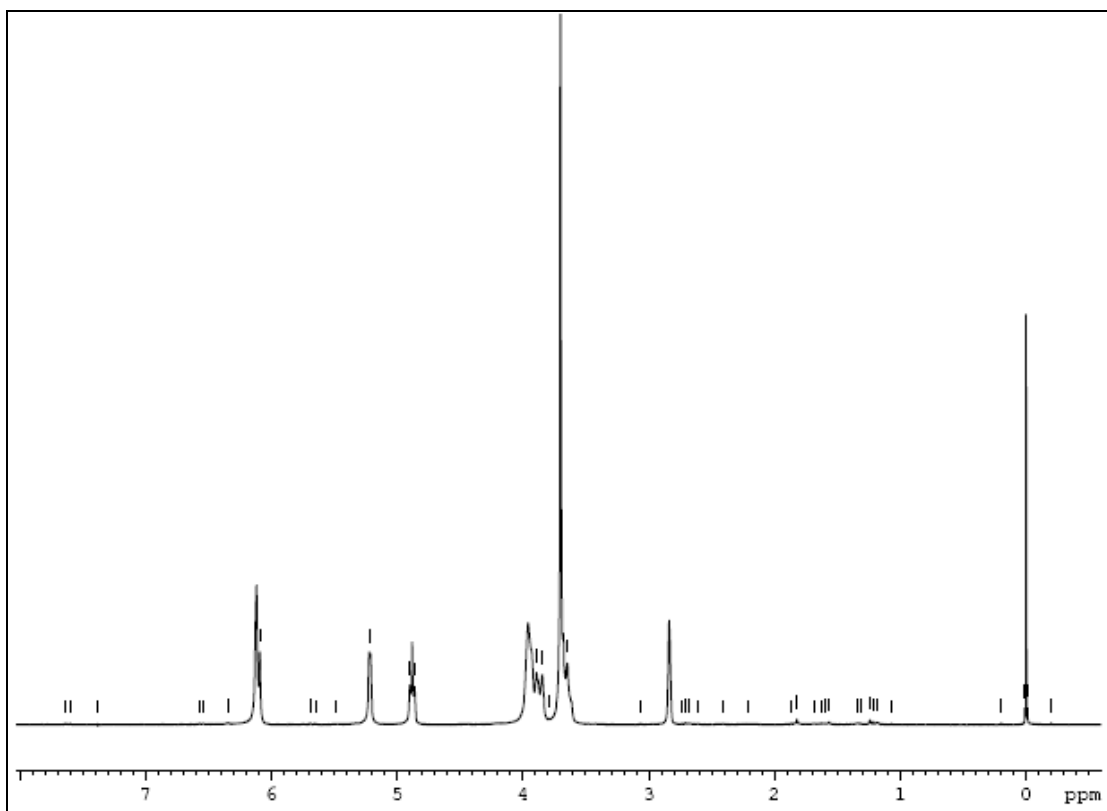


Figura 26 – Ressonância magnética nuclear em complexo de inclusão A. ^1H RMN, 300MHz.

Tabela 7 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão G, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 70°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.

^1H RMN - 70°C			
Pico	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	γ-CD	Complexo G	
Aprox. 5,8ppm	5,787	5,756	-0,031
	5,747	N/D	N/A
Aprox. 5,7ppm	5,722	5,688	-0,034
	5,702	5,665	-0,037
Aprox. 5,1ppm	5,164	5,136	-0,027
	5,152	5,124	-0,028
Aprox. 4,5ppm	4,522	4,484	-0,038
	4,504	4,465	-0,039
	4,487	4,447	-0,040
Aprox. 3,9ppm	3,926	3,900	-0,026
	3,876	N/D	N/A
	3,862	N/D	N/A
	3,839	N/D	N/A
	3,864	3,830	-0,034
	3,846	3,816	-0,030
	3,793	N/D	N/A
Aprox. 3,6ppm	3,813	3,783	-0,030
	3,652	3,623	-0,029
	3,603	N/D	N/A
	3,621	3,592	-0,028
	3,590	3,580	-0,010

Tabela 8 – Diferenças de deslocamento do pico de H (em ppm) entre γ -CD e complexo de inclusão G, obtido através dos resultados individuais das amostras, a 25°C. Em destaque encontram-se os deslocamentos químicos onde a variação foi significativa.

^1H RMN - 25°C			
Pico	δ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	γ-CD	Complexo G	
Aprox. 5,9ppm	6,120	6,082	-0,038
	6,091	6,055	-0,035
Aprox. 5,0ppm	5,220	5,189	-0,031
	5,210	5,182	-0,028
Aprox. 4,6ppm	4,897	4,868	-0,028
	4,880	4,850	-0,030
	4,860	4,832	-0,028
Aprox. 3,7ppm	3,960	3,926	-0,034
	3,889	3,857	-0,032
	3,845	3,814	-0,030
Aprox. 3,4ppm	3,700	3,689	-0,011
	3,646	3,647	0,001
	3,616	N/D	N/A
	3,583	N/D	N/A
Aprox. 2,6ppm	2,623	N/D	N/A
	2,830	2,617	-0,213
	2,612	N/D	N/A
	2,607	N/D	N/A

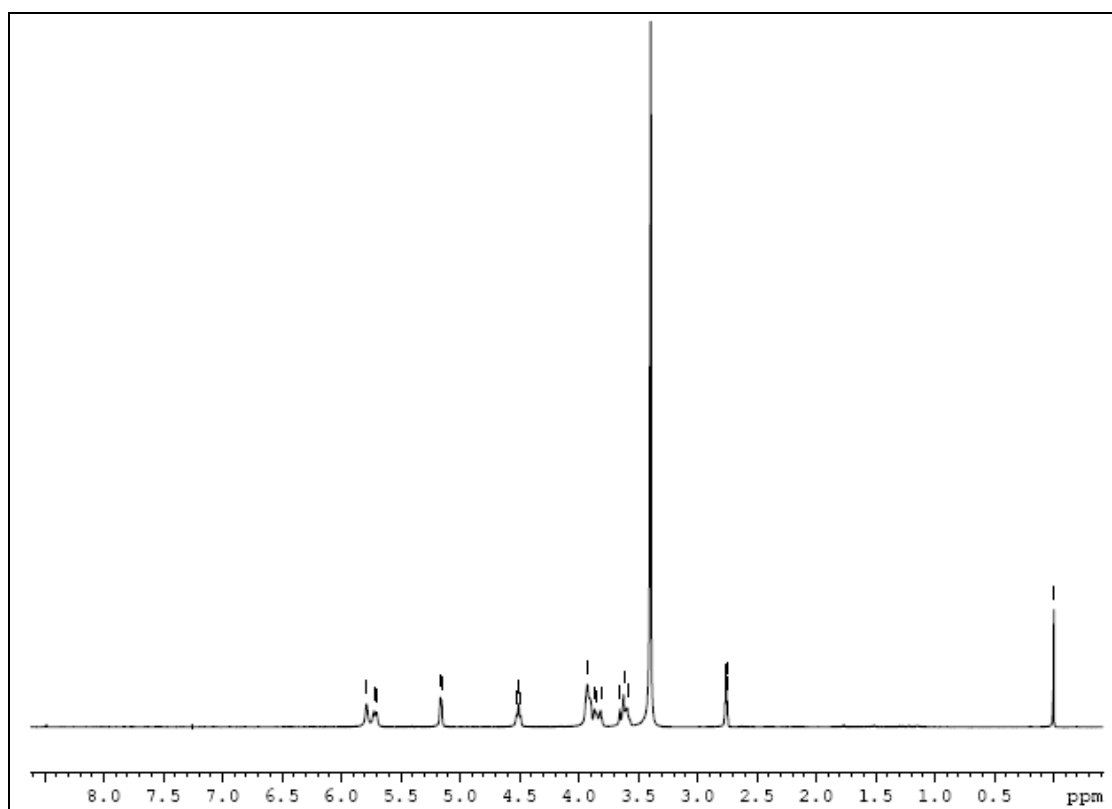


Figura 27 – Ressonância magnética nuclear em γ -CD. ^1H RMN, 300MHz, em DMSO.

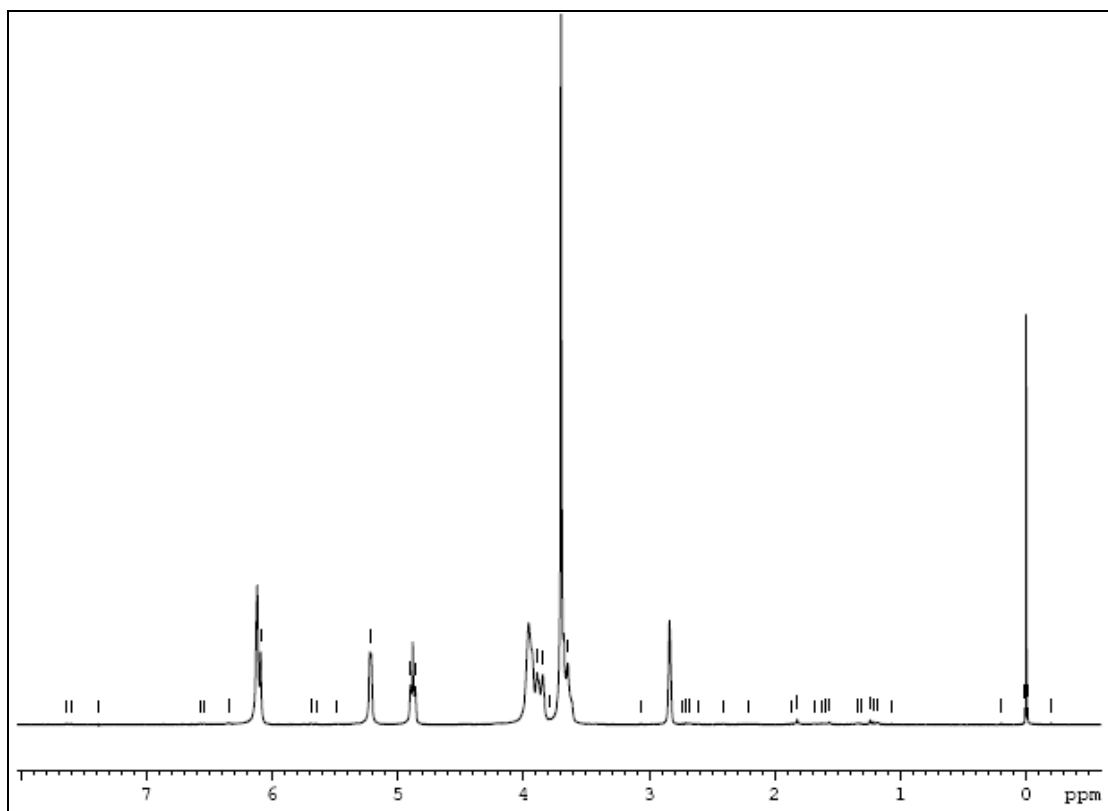


Figura 28 – Ressonância magnética nuclear em complexo de inclusão G. ^1H RMN, 300MHz.

Foi possível atribuir os carbonos do princípio ativo através da técnica de ^{13}C RMN (Fig.29), confrontando os deslocamentos químicos teóricos de ^{13}C e ^1H obtidos pelo software "CHEMOFFICE 2007" em relação aos dados experimentais (Fig.30 e 31), e tabulados na Tabela 9.

Após atribuições dos carbonos pertencentes ao VB, foram analisados o princípio ativo, γ -ciclodextrina, complexo A e complexo G, sob as mesmas condições (Fig.32). Ao se comparar os deslocamentos químicos das amostras acima citadas foi possível observar uma diferença nos deslocamentos químicos dos ^{13}C correspondente ao VB.

É então levantada a hipótese das posições de complexação do princípio ativo com a γ -ciclodextrina, corroborada pelos resultados obtidos na análise por infravermelho médio por transformada de Fourier. Estas posições seriam através da porção dos carbonos 1-5, e também através dos carbonos 20 e 23.

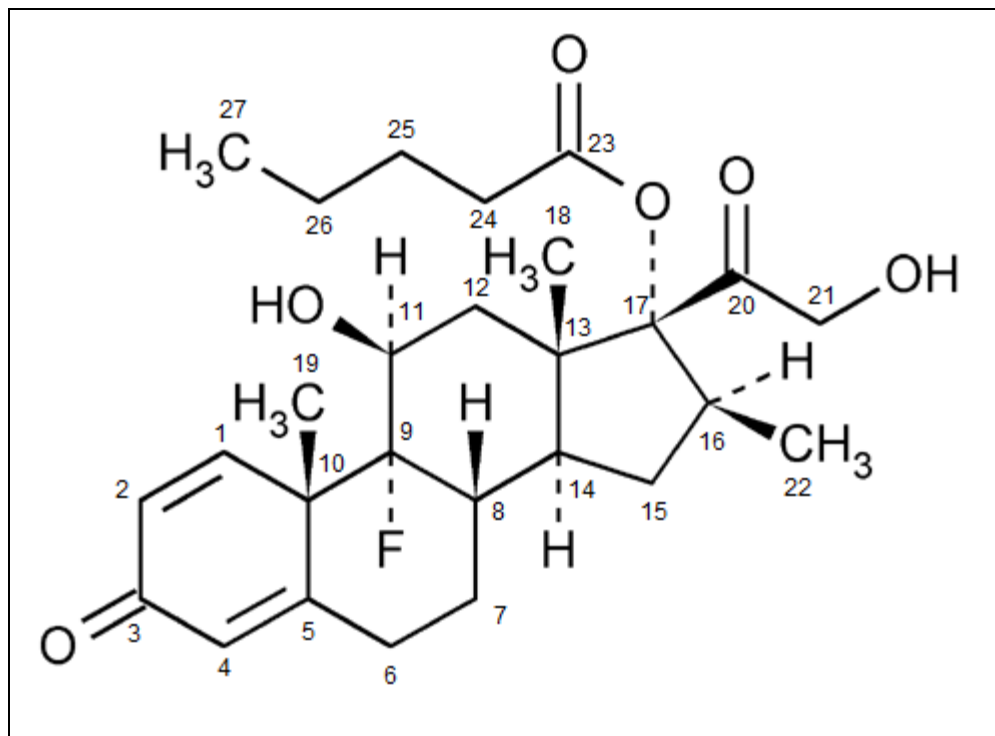


Figura 29 – Estrutura molecular do princípio ativo 17-valerato de betametasona, com a numeração de seus carbonos.

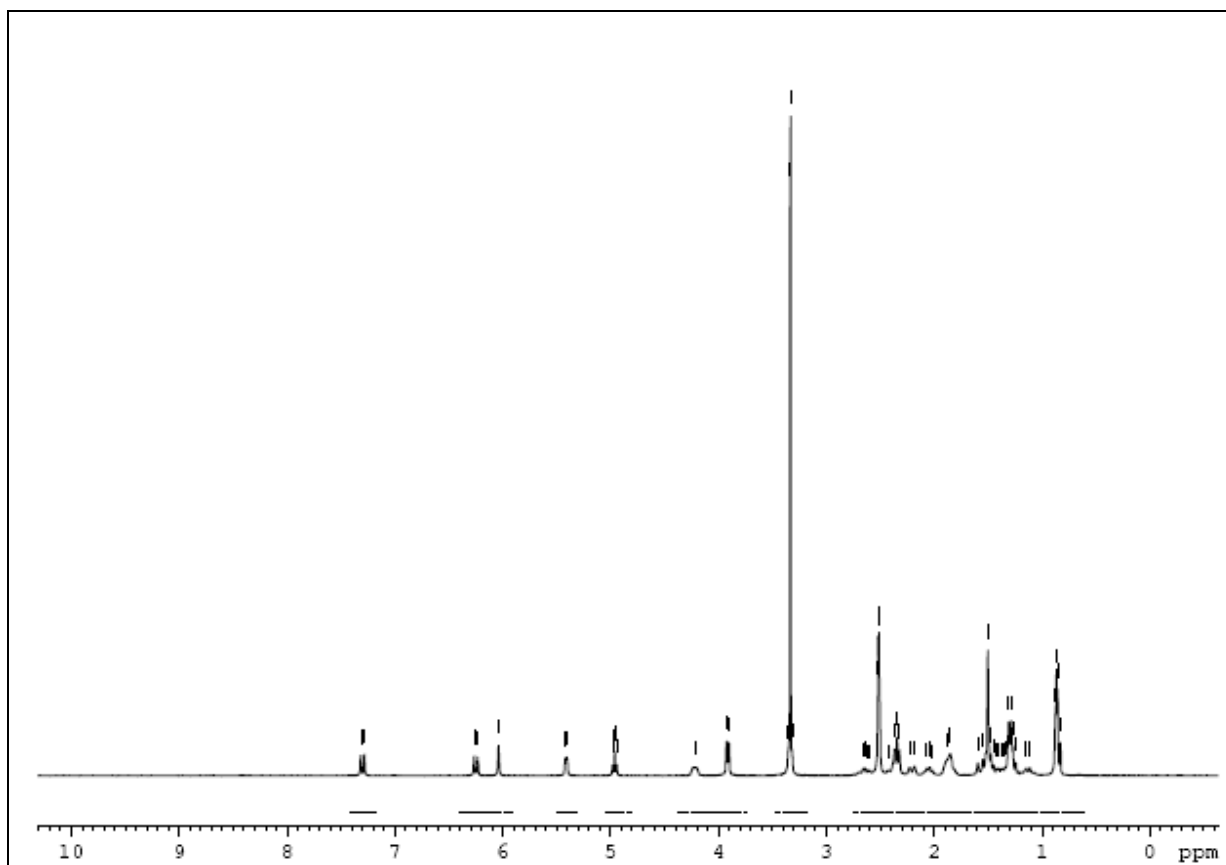


Figura 30 – Ressonância magnética nuclear em 17-valerato de betametasona. ^1H RMN, 300MHz.

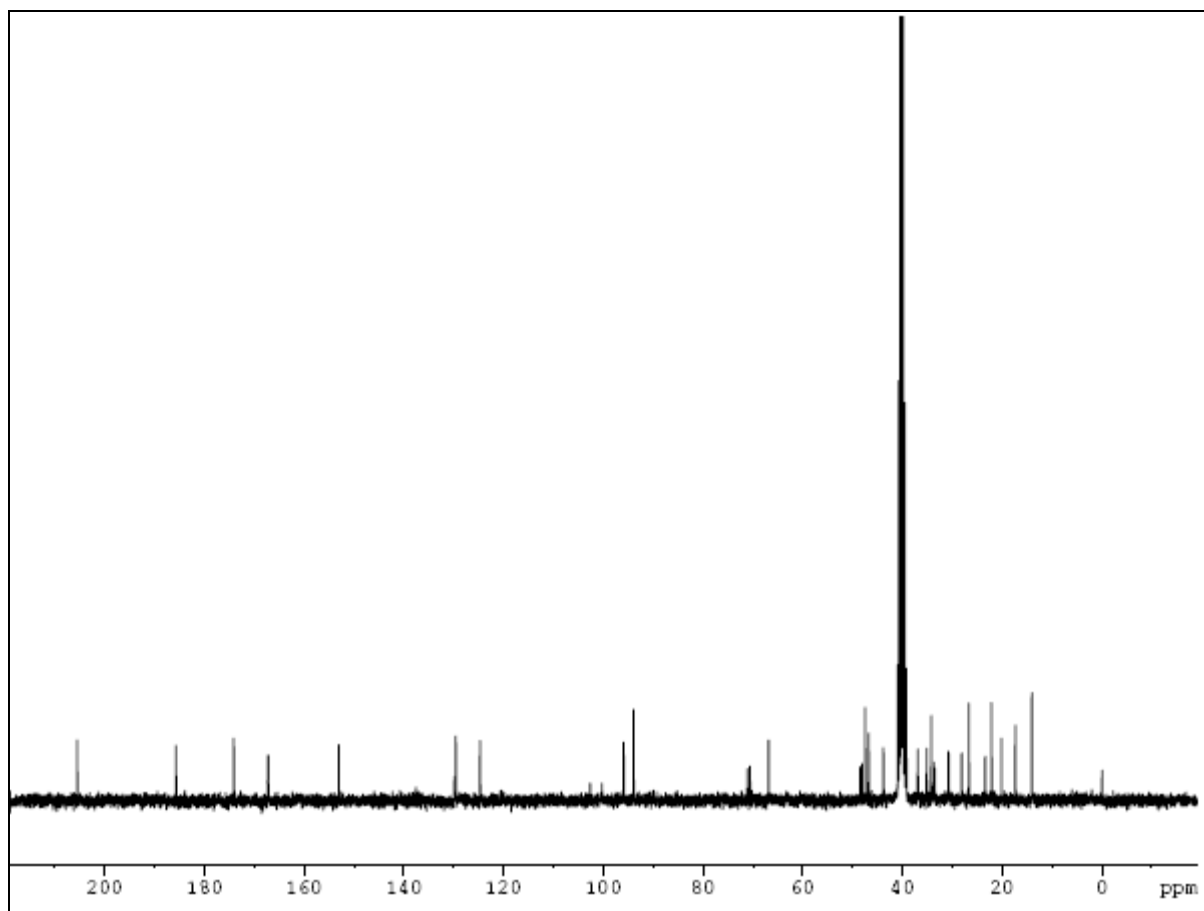


Figura 31 – Ressonância magnética nuclear em 17-valerato de betametasona. ^{13}C RMN, 300MHz.

Tabela 9 – Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C e ^1H teóricos baseados no software "CHEMOFFICE 2007", em relação aos deslocamentos químicos experimentais. Onde: *s* = singleto, *d* = duplete, *t* = tripleto e *m* = multiplete.

N° Carbono	Grupamento	^{13}C		^1H	
		Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
1	CH	155,4	152,5	6,28 <i>d</i>	7,25
2	CH	128,4	129,0	6,34 <i>d</i>	6,22
3	CO	185,8	185,2	-	-
4	CH	124,2	124,1	6,09 <i>s</i>	5,99
5	C	168,3	166,7	-	-
6	CH ₂	33,0	30,2	2,01 e 1,91	2,29 e 2,60
7	CH ₂	25,2	26,1	1,41 e 1,16	2,30 e 1,36
8	CH	38,7	33,5	1,68	-
9	CF	100,3	100,9	-	-
10	C	54,7	47,71	-	-
11	CH	70,5	70,0	3,43 <i>t</i>	4,19
12	CH ₂	33,5	36,4	1,63 e 1,38	1,77 e 1,10
13	C	38,9	46,9	-	-
14	CH	40,8	46,2	1,40	2,01
15	CH ₂	32,8	34,6	1,55 e 1,30	2,66 e 2,30
16	CH	33,1	43,3	2,49 <i>m</i>	1,80
17	C	94,0	93,4	-	-

N° Carbono	Grupamento	¹³ C	¹³ C	¹ H	¹ H
		Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
18	CH ₃	14,5	19,6	-	-
19	CH ₃	18,9	22,8	1,16 s	1,27
20	C	211,2	205,0	-	-
21	CH ₂	64,5	66,2	4,69 s	3,87
22	CH ₃	12,6	13,5	1,06 d	0,82
23	C	173,1	173,5	-	-
24	CH ₂	33,9	33,8	2,25 t	2,30
25	CH ₂	27,3	27,5	1,68 m	1,46
26	CH ₂	22,2	26,2	1,33 m	1,24
27	CH ₃	13,8	16,7	0,96 t	0,89

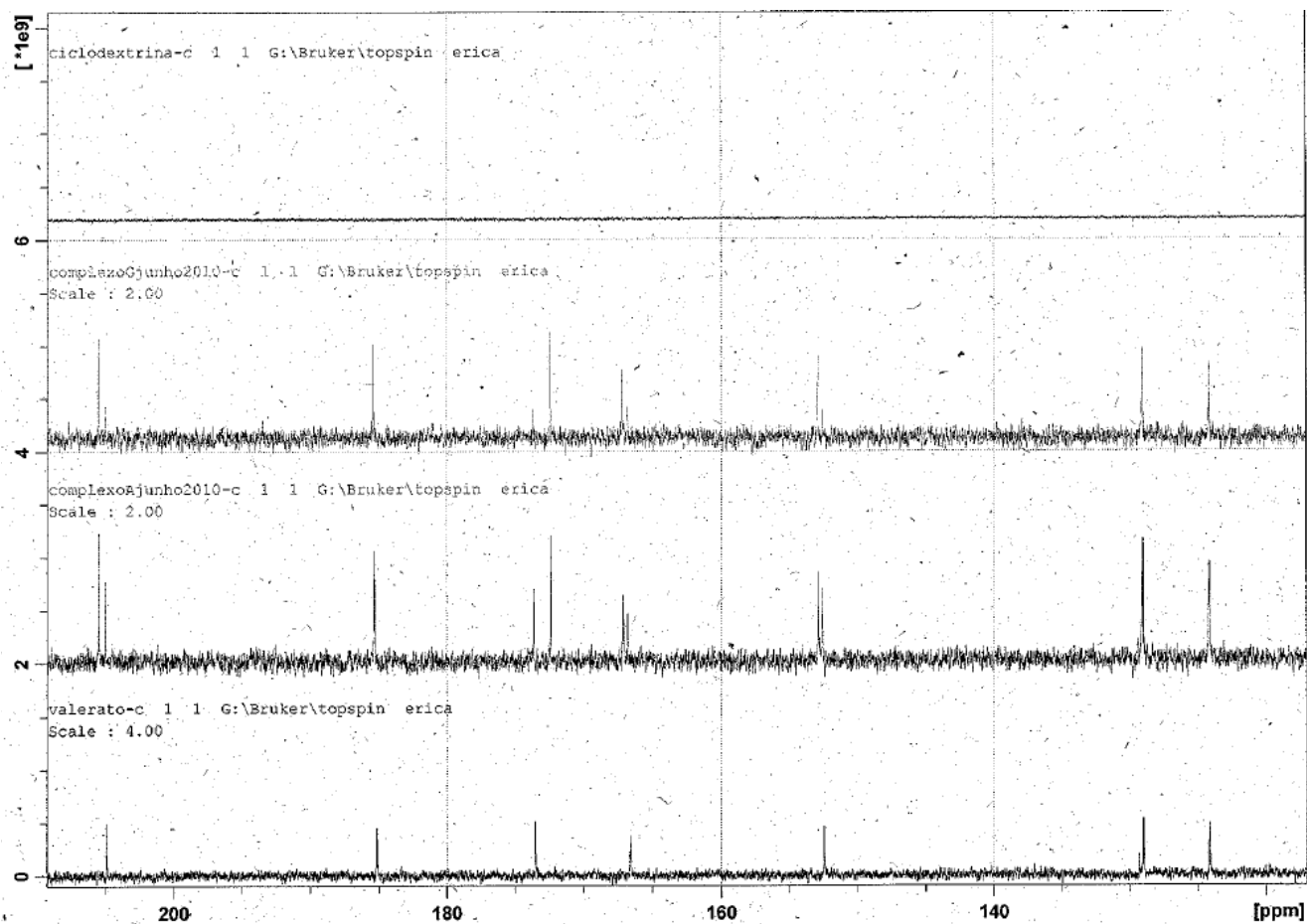


Figura 32 – Ressonância magnética nuclear em VB, γ -ciclodextrina, complexo de inclusão A e complexo de inclusão G. ¹³C RMN, 300MHz.

A estabilidade térmica dos complexos de inclusão A (Fig.29) e G (Fig.30) foram determinadas em comparação ao PA (Fig.31) em questão. Foram aplicados isoterma a cada amostra por um período de 240 minutos, variando entre 140 à 220°C.

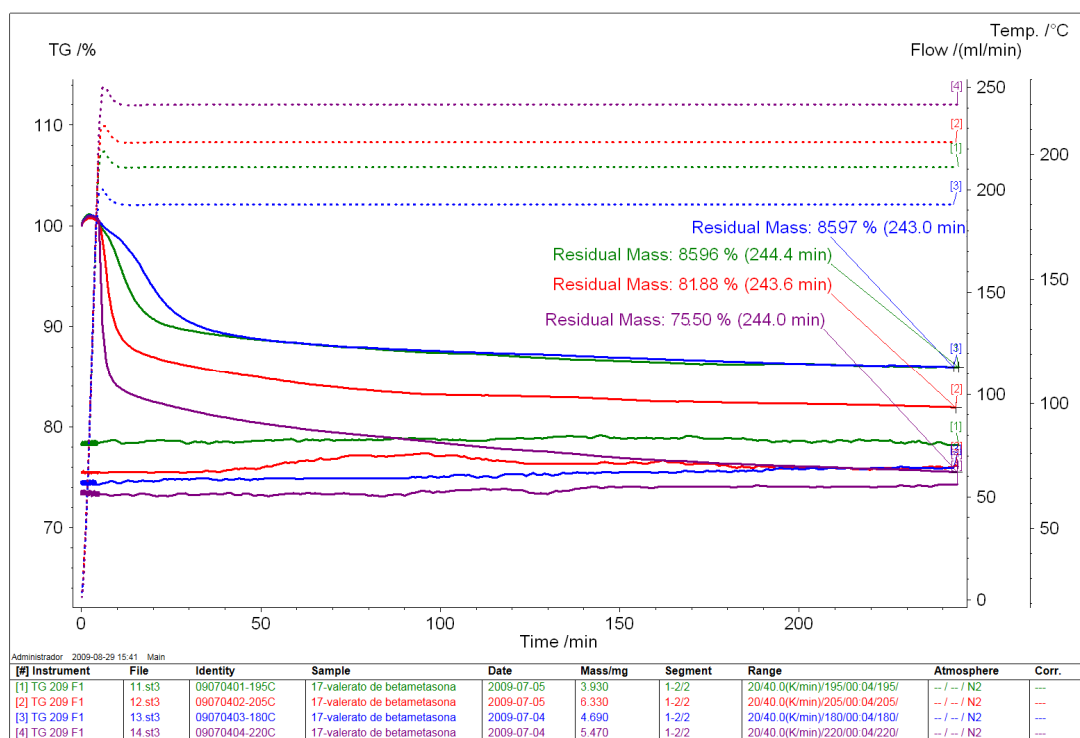


Figura 33 – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o princípio ativo 17-valerato de betametasona. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar.

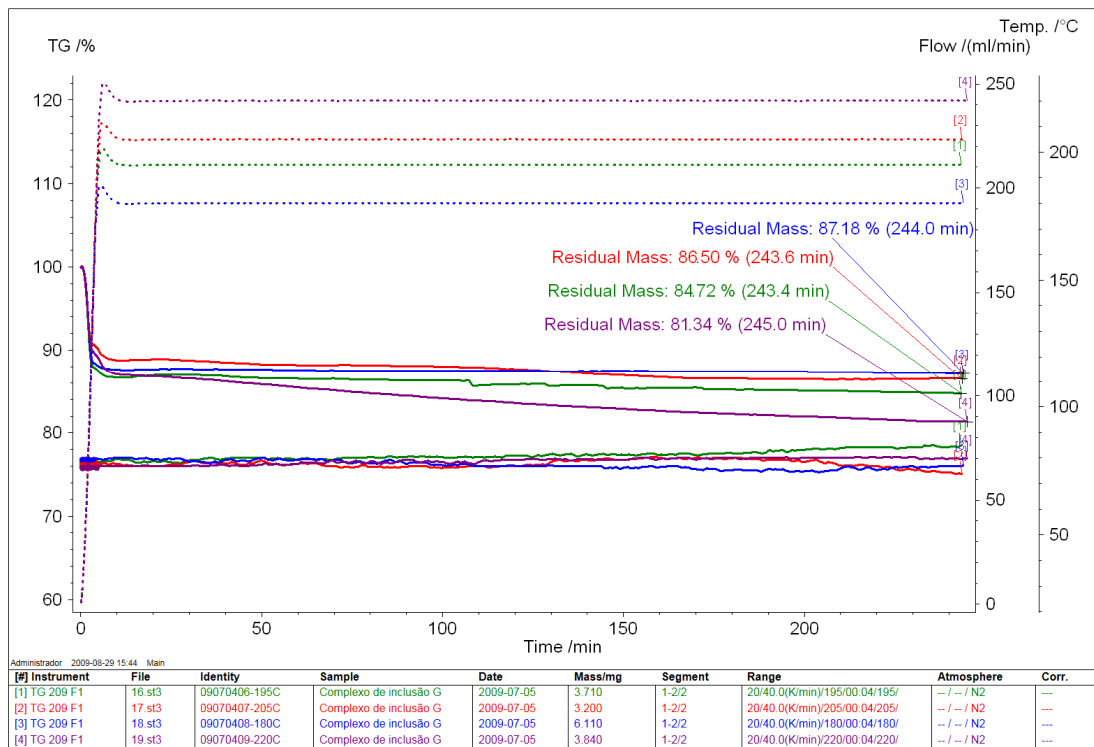


Figura 34 – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o complexo de inclusão G. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar.

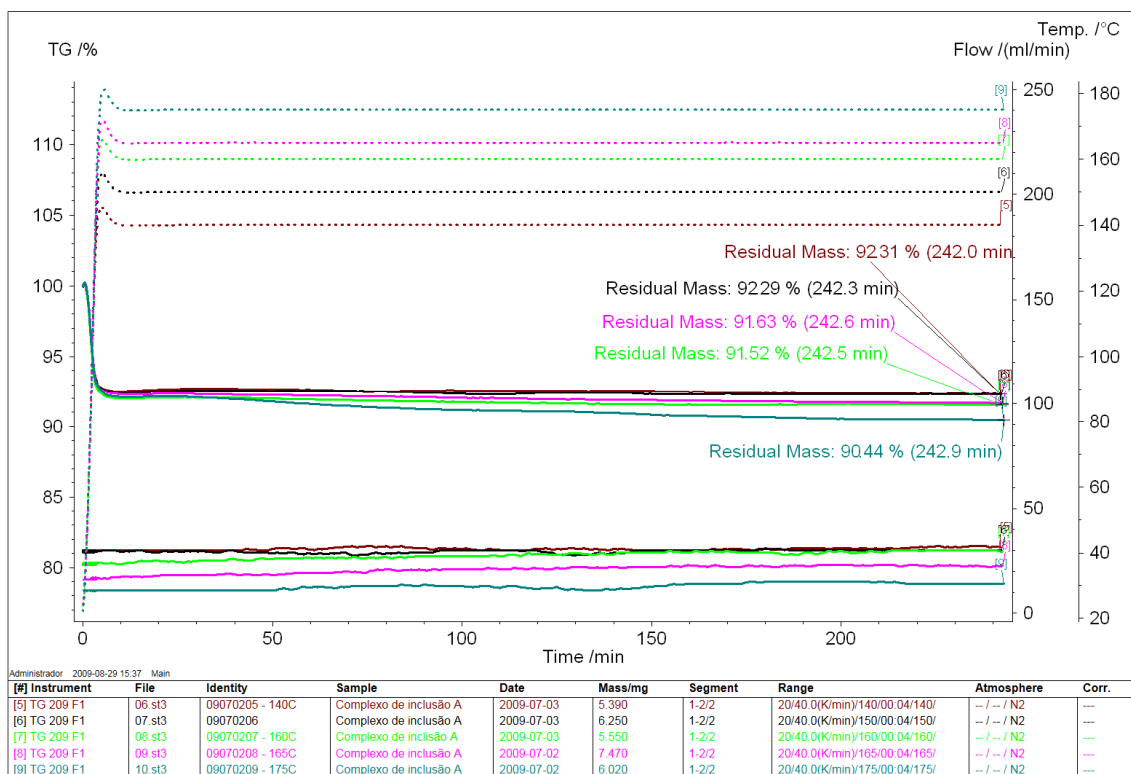


Figura 35 – Estudo isotérmico em diferentes temperaturas (isotermas) para o complexo de inclusão A. Razão de 40°C/min. e ambiente de ar.

Os resultados obtidos mostram de forma clara que o PA sofre uma maior tendência de degradação quando comparado aos complexos estudados (Fig.29-31). Assim os valores encontrados foram plotados para uma equação de reta e uma linha de tendência foi determinada para cada amostra. Esta metodologia foi adaptada visto que a equação de Arrhenius não é aplicável a amostras diferentes, i.e., PA e complexos de inclusão, pois estes possuem em sua composição moléculas diferentes e seu comportamento de degradação também é diferente. Isso é facilmente identificado pela presença de água nas γ -CD em até 11%, ocorrendo um decaimento em menos de 10 minutos nas temperaturas estudadas devido à perda dessa água; já no PA a perda de água é insignificante uma vez que está apresenta um limite de 0,5% de umidade em sua especificação.

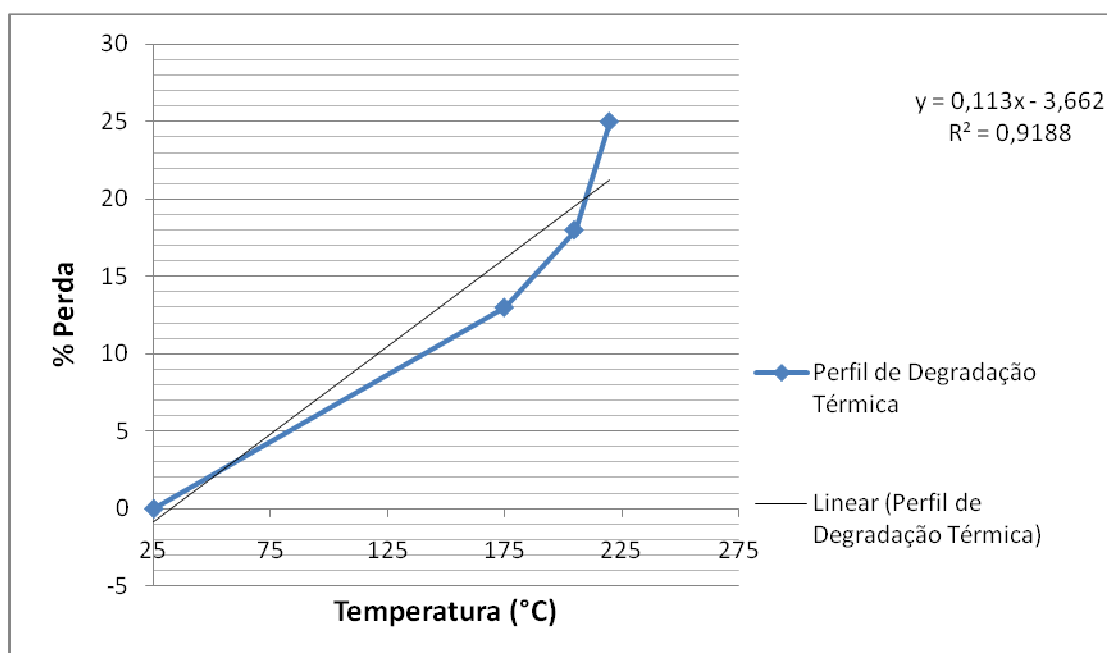


Figura 36 – Perfil de degradação e linha de tendência do 17-valerato de betametasona nas temperaturas de 25, 175, 205 e 220°C.

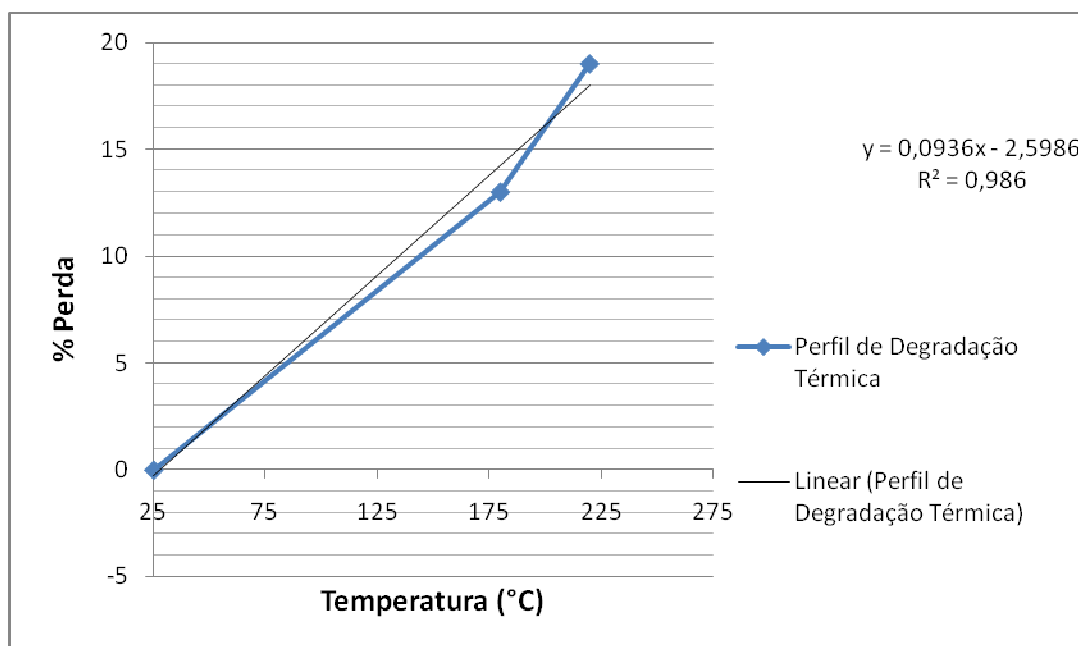


Figura 37 – Perfil de degradação e linha de tendência do complexo de inclusão A nas temperaturas de 25, 180 e 220°C.

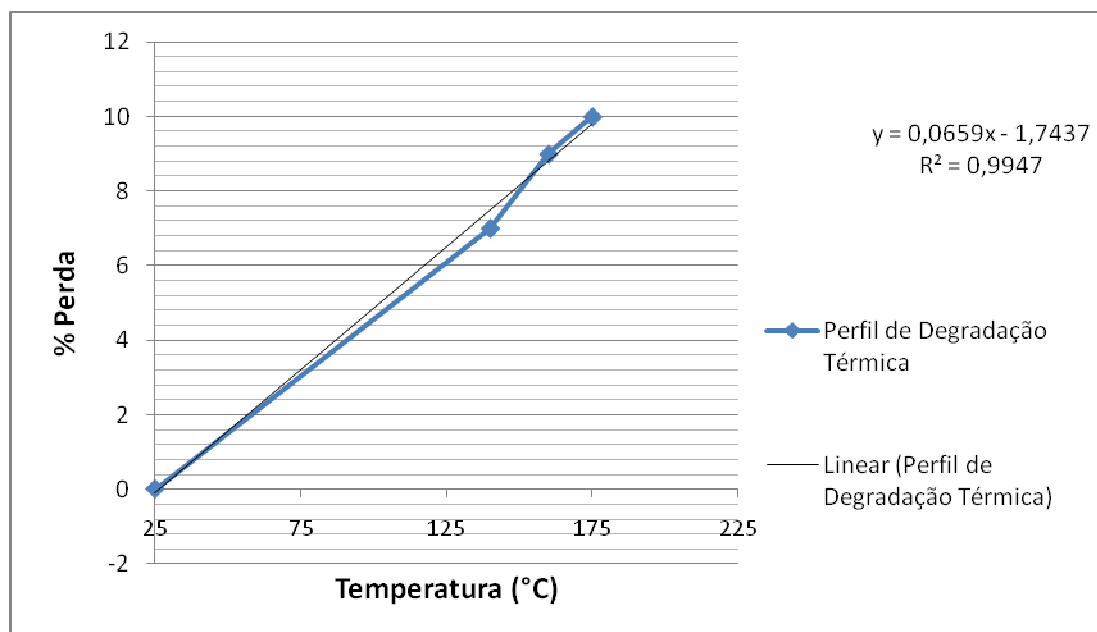


Figura 38 – Perfil de degradação e linha de tendência do complexo de inclusão G nas temperaturas de 25, 140, 160 e 175°C.

Por fim, foi possível avaliar a diferença de estabilidade térmica entre os complexos de inclusão e o princípio ativo. Houve um aumento de 21 e 71% de estabilidade térmica dos compostos G e A, respectivamente, em relação ao princípio ativo.

Nos últimos anos, com a introdução da RE n°1, de 29 de Junho de 2005 (ANVISA) que trata das modificações das condições de armazenamento e guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos no Brasil, foi possível verificar a preocupação das indústrias farmacêuticas com o prazo de validade de seus produtos, devido à possível instabilidade frente à condição estressante de armazenamento. Algumas das possíveis soluções para garantir a estabilidade de seus produtos são: a diminuição no prazo de validade, mudanças na formulação do produto ou mudança na condição de armazenamento.

O princípio ativo 17-valerato de betametasona tornou-se um potencial fármaco para estudo, devido à sua instabilidade frente a ácidos e bases, levando ao

seu rearranjo para o seu isômero menos ativo o 21-valerato de betametasona (Gardi *et al.*, 1963; Vitali & Gardi, 1972; Yip & Po, 1979; Bundgaard & Hansen, 1981; Anderson & Taphouse, 1981 e Yip *et al.*, 1983), principalmente, quando em formulações semi-sólidas, o que já foi amplamente estudado por Yip e Po, 1979 e Ryatt *et al.*, 1982. Além disso, seu estudo causa interesse por sua alta potência glicocorticóide e baixa atividade mineralocorticóide, dentre os corticosteróides, conforme tabela 1.

A complexação com CDs tem como uma de suas finalidades a estabilização de moléculas e mudança em suas características físico-químicas, no caso daquelas lipofílicas que se comportam como hidrofílicas quando complexadas. Dentre as diferentes CDs estudadas, a γ -CD apresentou a melhor complexação com o VB, quando realizado o teste de solubilidade de fases proposto por Higuchi e Connors em 1965, e analisadas por CLAE, sendo possível determinar a força e a razão da complexação dentre as diferentes proporções avaliadas.

Após seleção da CD de trabalho, foram testados diferentes métodos de complexação que tivessem como características alto rendimento e praticidade de preparação. Os métodos de malaxagem e coevaporação foram selecionados, de acordo com o proposto por Veiga *et al.*, 2006. Os complexos de inclusão formados (oito preparações) foram então caracterizados através de três técnicas bem estabelecidas, e amplamente utilizadas nesta área, que são: a calorimetria exploratória diferencial, infravermelho médio com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear.

Inicialmente, foi utilizado o método de caracterização por calorimetria exploratória diferencial, pois:

Uma distinção pode ser feita entre a absorção em superfície e a formação de complexos de inclusão, através da análise térmica. A presença de complexo de inclusão pode ser observada indiretamente devido a mudanças (e.g., na evaporação, decomposição térmica, oxidação, fusão ou polimorfismo em relação à droga não complexada. (Aigner et al., 2002).

Através, deste método foi possível verificar a ausência do pico endotérmico de fusão do PA para os diferentes complexos estudados, evidenciando a formação do complexo de inclusão devido a mudanças nas interações moleculares da CD e PA, confirmada na análise da mistura física 1:1 (mesma razão definida na formação do complexo), onde foi possível observar a presença de dois picos endotérmicos.

A caracterização através de método por infravermelho médio com transformada de Fourier foi estudada a fim de se validar os resultados encontrados no método anterior. Assim, os complexos de inclusão foram avaliados em relação a variações nas bandas de absorção características de grupos funcionais do PA. Porém, de acordo com Szejtli, 1994 e Hedges, 1988, os espectros de infravermelho médio devem ser avaliados com cautela, pois as CDs possuem muitas bandas de absorção no infravermelho e, como geralmente os fármacos representam em média não mais que 15% da massa do complexo de inclusão formado, a visualização de deslocamentos de bandas de absorção de grupos funcionais do PA podem se tornar encobertos por bandas da CD impedindo a avaliação de formação de complexos.

A utilização da técnica de infravermelho médio com transformada de Fourier para esta avaliação deve ser limitada a fármacos com bandas de absorção características (Uekama & Otagiri, 1987 *apud* Veiga et al., 2006). Neste caso, a técnica foi utilizada, devido ao VB representar mais que 40% da massa do complexo de inclusão formado, e possuir bandas de absorção características. Realizados os testes, foi possível evidenciar o desaparecimento das bandas características de estiramento da carbonila de grupos cetônicos presentes no PA, permitindo a

suposição das posições da complexação da CD com o fármaco (20-cetona, 3-cetona e/ou Δ 1,4-dieno).

Por fim, a técnica de ressonância magnética nuclear foi utilizada para confirmar a formação do complexo de inclusão. É utilizada na investigação de complexos de inclusão, e caracteriza-se por uma avaliação de interação entre o fármaco e a CD (Djedaini *et al.*, 1990). De acordo com Djedaini *et al.*, 1990 e Schneider *et al.*, 1998, a técnica de ressonância magnética nuclear permite diferenciar fenômenos de inclusão de interações externas entre o fármaco e CD. A inclusão do fármaco dentro da cavidade da CD faz com que seu espectro de RMN evidencie a formação do complexo pela origem de novos sinais, seja em sua forma livre ou complexada, ou deslocamentos de bandas na espectroscopia de RMN- ^1H (Ficarra *et al.*, 2000).

*Assim, a espectroscopia de RMN- ^1H constitui a metodologia mais rigorosa para a comprovação da formação de complexos de inclusão fármaco-CD, em solução, por intermédio do monitoramento das variações dos desvios químicos dos prótons internos da cavidade das CDs (H-3 e H-5). Os desvios destes prótons são geralmente causados por efeitos magnéticos anisotrópicos exercidos pela parte da molécula de fármaco que penetra no interior da cavidade apolar da CD, manifestando-se em desvios das ressonâncias para campos mais altos. (Ganza-Gonzalez *et al.*, 1994; Cotta Ramusino *et al.*, 1998).*

Após a caracterização do complexo de inclusão, sua estabilidade térmica foi determinada através da termogravimetria, aplicando-se isoterma e avaliada a perda de massa de cada complexo e do VB, de acordo com o tempo. Os resultados encontrados foram plotados para uma equação de reta e uma linha de tendência foi determinada para cada composto. Os complexos de inclusão estudados mostram uma rápida degradação de cerca de 10% de sua massa nos primeiros 10 minutos devido à presença de água em sua composição, a percentagem de água presente no princípio ativo é de cerca de 0,5%. Na avaliação visual das isotermas (Fig.29-31)

é possível reconhecer a maior estabilidade térmica dos complexos de inclusão em comparação ao VB. Após o cálculo de cada composto verificou-se que os complexos de inclusão G e A, possuem uma estabilidade térmica 21 e 71% maiores que o PA.

Os complexos de inclusão com CDs mostram-se eficientes na estabilização de fármacos instáveis em determinadas condições, além de mudanças nas características físico-químicas em relação ao princípio ativo puro, que podem auxiliar na formulação/manipulação do produto e sua biodisponibilidade. Neste trabalho, métodos para sua caracterização foram definidos a fim de elucidar a formação deste complexo e não apenas a formação de uma mistura física.

6. CONCLUSÃO

1. Foram obtidos complexos de inclusão por coevaporação e malaxagem.
2. Os complexos de inclusão obtidos foram caracterizados e analisados por CLAE.
3. Os complexos de inclusão obtidos foram caracterizados por técnicas de análise térmica.
4. Os complexos de inclusão obtidos foram caracterizados por espectrofotometria no infravermelho médio com transformada de Fourier.
5. Os complexos de inclusão obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear.
6. Os complexos obtidos mostraram um aumento de 21 e 71% em relação à estabilidade térmica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIGNER, Z.; KÉZSMÁRKI, A.; KATA, M.; NOVÁK, C.; ERÖS, I. Investigation of tenoxicam and γ -cyclodextrin binary and ternary complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.42, p.227-233, 2002.
2. ANDERSEN, F.M.; BUNDGAARD, H. The influence of cyclodextrin complexation on the stability of betamethasone-17-valerate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.20, p.155-162, 1984.
3. ANDERSON, B.D.; TAPHOUSE, V. Initial rate studies of hydrolysis and acyl migration in methylprednisolone-21-hemisuccinate and 17-hemisuccinate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, p.181-186, 1981.
4. ANTISPERGER, G. New aspects in cyclodextrins toxicology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS, 6, Chicago, 1992. **Minutes**. Chicago: Editions de Sante, 1992. p.277-283.
5. ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; Santos FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.260, n.2, p.303-314, 2003.
6. BRATU, I.; GAVIRA-VALLEJO, J.M.; Hernanz, A. $^1\text{H-NMR}$ study of the inclusion processes for α - and γ -cyclodextrin with fenbufen. **Biopolymers**, v.77, n.6, p.361-367, 2005.
7. BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, p.645-666, 2007.
8. BRITTO, M.A.F.O.; NASCIMENTO, C.S.; SANTOS, H.F. Análise estrutural de CDs: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v.27, p. 882-888, 2004.

9. BUNDGAARD, H.; HANSEN, J. Studies on the stability of corticosteroids. VI. Kinetics of the rearrangement of betamethasone-17-valerate to the 21-valerate ester in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.7, n.3, p.197-203, 1981.
10. CIDES, L.C.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal behaviour, compatibility study and decompositions kinetics of glimepiride under 16 isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.84, p.441-445, 2006.
11. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456p.
12. COTTA RAMUSINO, M.; BARTOLOMEI, M.; GALLINELLA, B. ^1H NMR, UV and Circular Dichroism Study of inclusion complex formation between the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton and β - and γ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.32, n.4, p.485-498, 1998.
13. DJEDAINI, F.; LIN, S.Z.; PERLY, B.; WOUESSIDJEW, D. High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β -cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.79, p.643-646, 1990.
14. FERNANDES, V.J.J.; ARAÚJO, A.S.; MEDEIROS R.A.; MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; SILVA, A.O.; MELO, D.M.A. Kinetic parameters of polyethylene degradation by the natural zeolite chabazite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.56, p.1279-1282, 1999.
15. FICARRA, R.; FICARRA, P.; DI BELLA, M.R.; RANERI, D.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M.L.; GAMBERINI, M.C.; RUSTICHELLI, C. Study of β -blockers/ β -cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p. 33-40, 2000.

16. FLOOD, K.G.; REYNOLDS, E.R.; SNOW, N.H. Characterization of inclusion complexes of betamethasone-related steroids with cyclodextrins using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.903, p.49-65, 2000.
17. FRANK, D.W.; GRAY, J.E.; WEAVER, R.N. Cyclodextrin nephrosis in the rat. **American Journal of Pathology**, v.83, p.367-374, 1976.
18. FRENCH, D. Schardinger dextrans. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v.12, p.189-260, 1957.
19. GANZA-GONZALEZ, A.; VILA-JATO, J.L.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F.J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.106, n.3, p.179-185, 1994.
20. GARDI, R.; VITALI, R.; ERCOLI, A. Derivati di condensazione nelle catena laterale di corticosteroidi. **Gazzetta Chimica Italiana**, v.93, p.431-450, 1963.
21. GIRON, D. Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.4, p. 755-770, 1986.
22. GOMES-PINHO, J.J.R.; MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; MIYANO, M.H.; STORPIRTIS, S. Application of thermal analytical methods in pre-formulation study of metformim hydrochloride tablets. In: ANAIS DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA, 47, São Paulo, 1998. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Química, 1998. p.305-307.
23. HEDGES, A.R. Industrial application of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.2035-2044, 1998.
24. HIASA, Y.; OSHIMA, M.; KITAHORI, Y.; YUASA, T.; FUJITA, T.; IWATA, C.; MIYASHIRO, A.; KONISHI, N. Histochemical studies of β -cyclodextrin nephrosis in

- rats. **Journal of Nara Medical Association**, v.32, p.316-326, 1981. *apud* VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. p.93.
25. HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v.4, p.127-212, 1965.
26. HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.36, n.1, p.125-141, 1999.
27. IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, n.2, p.147-162, 1997.
28. KIM, S.H.; YOUN, J.Y.; KIM, K.M.; KANG, K.C.; PYO, H.B.; LEE, S.J. Characterization of a inclusion complex of, 7-dehydrocholesterol and cyclodextrin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.16, p.119-121, 2010.
29. LOTTER, A.P.; MALAN, C.E.P.; VILLIERS, M. Evaluation of compatibility of tablet excipients with albendazole and closantel using DSC and HPLC. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.23, p.533-537, 1997.
30. MCKENZIE, A.W.; ATKINSON, R.M. Topical activities of betamethasone esters in man. **Archives of Dermatology**, v.89, p.741-746, 1964.
31. MOSHER, G., THOMPSON, D.O. Complexation and cyclodextrins. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C., eds. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p.531-558.
32. MURA, P.; BETTINETTI, G.P.; MANDERIOLI, A.; FAUCCI, M.T.; BRAMANTI, G.; SORRENTI, M. Interactions of ketoprofen and ibuprofen with β -cyclodextrins in solution and in the solid state. **International Journal of Pharmaceutics**, v.166, p.189-203, 1998.

33. NASH, R.A. Commentary on "hydroxypropyl cyclodextrins: potential synergism with carcinogens". **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.7, p.789, 1996.)
34. OTAGIRI, M.; FUJINAGA, T.; SAKAI, A.; UEKAMA, K. Effects of beta- and gamma-cyclodextrins on release of betamethasone from ointment bases. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, p.2401-2405, 1984.
35. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.
36. ROBERT, C.H. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides córtico-supra-renais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e ações dos hormônios córtico-supra-renais. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. New York: MacGraw-Hill, 1996. cap.60, p.951-969.
37. RODANTE, F.; CATALANI, G.; VECCHIO, S. Kinetic analysis of single or multi-step decomposition processes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.68, p.689-713, 2002.
38. RYATT, K.S.; FEATHER, J.W.; MEHTA, A.; DAWSON, J.B.; COTTERILL, J.A.; SWALLOW, R.S. The stability and blanching efficacy of betamethasone-17-valerate in emulsifying ointment. **British Journal of Dermatology**, v.107, p.71-76, 1982.
39. SCHNEIDER, H.J.; HACKET, F.; RÜDIGER, V.; IKEDA, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chemical Reviews**, v.98, n.5, p.1755-1786, 1998.
40. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490p.

41. SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. v.1, 645p.
42. SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; VERAS, J.W.E. Studies of cimetidine pre-formulated and tablets for TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**, v.392-393, p.99-106, 2002.
43. SZEJTLI, J.; SEBESTYÉN, G. Resorption, metabolism and toxicity studies on the peroral application of beta-cyclodextrin. **Starch/Stärke**, v.31, p.385-389, 1979.
44. SZEJTLI, J. **Cyclodextrin technology**. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publisher, 1988. 450p. (Topics in inclusion science).
45. SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v.76, p.1825-1845, 2004.
46. SZEJTLI, J. Cyclodextrin inclusion complexes. In: FRÖMMING, K.-H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrin in pharmacy**. London: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.45-82. Disponível em: http://books.google.com.br/books?id=Gnp5JPNK0_kC&printsec=frontcover&dq=Cyclodextrin+in+Pharmacy+1994&source=bl&ots=2Uw8owNIDO&sig=FLUPrXVE8Of0PERyxs45r6E08qk&hl=pt-BR&ei=jrZYTNC3B86RuAfws6zCCg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CCMQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 20.jul.10
47. THOMPSON, D.O. Cyclodextrins – enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, n.1, p.1-104, 1997.
48. UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrin in drug carrier systems. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.3, p.1-40, 1987. *apud* VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. p.75.

49. UNITED States Pharmacopeia: USP32; The National Formulary: NF27. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p.1665.
50. VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. 228p.
51. VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S.H.; Differential scanning calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.21, p.847-855, 1995.
52. VITALI, R.; GARDI, R. Hydrolysis of corticosteroid 17,21-alkylorthoesters in bufferef medium. An improved synthesis of 17-monesters. **Farmaco, Edizione Scientifica**, v.27, p.818-828, 1972.
53. WENDLANDT, W.W. The development of thermal analysis instrumentation 1955-1985. **Thermochimica Acta**, v.100, p.1-22, 1986.
54. YIP, Y.W.; PO, A.L.W.; IRWIN, W.J. Kinetics of decomposition and formulation of hydrocortisone butyrate in semiaqueous and gel systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.7, p.776-781, 1983.
55. YIP, Y.W.; PO, A.L.W. The stability of betamethasone-17-valerate in semi-solid bases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.31, p.400-402, 1979.