

**PREPARO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO DE  
HIDROCLOROTIAZIDA, PIOGLITAZONA E  
CLARITROMICINA EM CICLODEXTRINAS POR  
DIFERENTES TÉCNICAS: CARACTERIZAÇÃO E  
ESTUDOS BIOLÓGICOS**

**MARIA ARLETE SILVA PIRES**

UFMG-ICEx/DQ. 875<sup>a</sup>  
T. 376<sup>a</sup>

**MARIA ARLETE SILVA PIRES**

**PREPARO DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA,  
PIOGLITAZONA E CLARITROMICINA EM CICLODEXTRINAS POR  
DIFERENTES TÉCNICAS: CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Belo Horizonte**  
**2011**

P667p                    Pires, Maria Arlete Silva  
2011                    Preparo de compostos de inclusão de  
T                        hidrocloreotiazida, pioglitazona e claritromicina em  
                          ciclodextrinas por diferentes técnicas: caracterização  
                          e estudos biológicos / Maria Arlete Silva Pires. 2011.  
                          xviii, 127 f. : il.

Orientador: Doutor Rubén Dário Sinisterra Millán.  
Coorientador: Robson Augusto de Souza Santos.

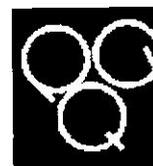
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química Inorgânica - Teses 2. Ciclodextrinas -  
Teses 3. Medicamentos - Teses 4. Raios X - Difração -  
Teses 5. Análise térmica - Teses 6. Diurese - Teses I.  
Sinisterra Millán, Rubén Dário, Orientador II. Santos,  
Robson Augusto de Souza, Coorientador. III. Título.

CDU 043



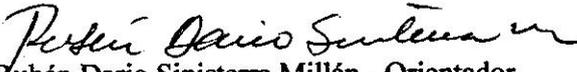
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

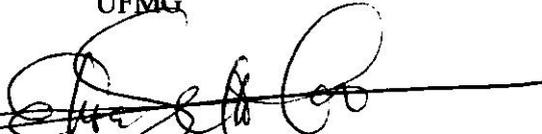


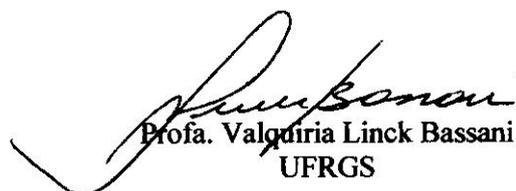
**"Preparo de Compostos de Inclusão de Hidroclorotiazida, Pioglitazona e Claritromicina em Ciclodextrinas por Diferentes Técnicas: Caracterização e Estudos Biológicos."**

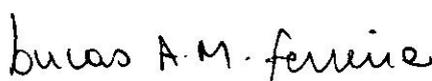
**Maria Arlete Silva Pires**

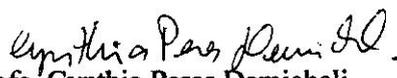
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

  
Profa. Elizabeth Igne Ferreira  
USP

  
Profa. Valquíria Linck Bassani  
UFRGS

  
Prof. Lucas Antônio Miranda Ferreira  
UFMG

  
Profa. Cynthia Peres Demicheli  
UFMG

Belo Horizonte, 17 de outubro de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do professor Doutor Rubén D. Sinisterra Millán e co-orientação do Prof. Doutor Robson Augusto de Souza Santos.

## **Agradecimentos**

A Deus simplesmente pelo fato de sempre olhar por nós.

Ao meu esposo Renato pelo apoio e por não me deixar desistir desta árdua jornada.

Ao Professor Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán pela paciência e pela orientação deste trabalho com quem aprendi muito nesta caminhada; por acreditar na minha capacidade e em meu trabalho, e pela oportunidade de realizar este projeto. Serviram como motivação para que eu realizasse mais este sonho.

Ao Professor Dr. Robson Augusto de Souza Santos pela co-orientação deste trabalho e por ter me recebido com muito carinho em seu laboratório.

Aos professores do departamento de química da UFMG pela generosidade, sugestões e colaborações. Dorila Piló, Maria Irene Ioshida e Nelcy Della Santina Mohallen, durante minha qualificação.

Aos colegas do laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais- DQ/ICEx- UFMG que me ajudaram todos estes anos, especialmente ao Joel pelos experimentos de *spray drying*.

Aos colegas do laboratório 290, especialmente a Débora, Jéferson e Rafael.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação Kátia, Paulete e Lílian, pela eficiência, atenção e colaboração durante todos estes anos.

A Ivana Lula, pelas ricas discussões sobre RMN.

A Juliana Alves S. Oliveira, pelas ricas discussões a respeito de DRX.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

A Fundação Ezequiel Dias – FUNED e à PHARLAB Indústria Farmacêutica, pelo apoio na elaboração deste trabalho.

A Junio Alves, e ao Zezé pelo auxílio no Laboratório de Hipertensão;

Ao meu pai mesmo que neste momento não esta presente fisicamente, mas que sempre acreditou em mim e sempre me incentivou na busca da sabedoria.

A minha querida mãe que neste período sempre veio me socorrer nos momentos mais difíceis desta jornada.

A minhas queridas irmãs Elizabete, Elizete, Bernardete, Cidinha, Gorete e Ivonete, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida e também por me apoiar sempre, por compreender os momentos minha ausência neste período.

A meus filhos, João Renato, Mariana e Letícia pelo amor e por ser fonte de força e de esperança, e por às vezes não entender as minhas ausências.

Enfim a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

Medicamento é um produto farmacêutico com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É imprescindível que o mesmo seja seguro e eficaz, tornando-se necessário o conhecimento de suas características físico-químicas. Dentre estas características, a velocidade de dissolução é uma fase limitante na velocidade de absorção do fármaco. Atualmente, cerca de 33% dos medicamentos comercializados apresentam problemas de dissolução. A indústria farmacêutica utiliza estratégias para aumentar a solubilidade dos fármacos e, conseqüentemente, sua taxa de dissolução e biodisponibilidade. Uma das estratégias é o uso das ciclodextrinas, que constituem uma classe de excipientes farmacêuticos viáveis econômica e tecnicamente. Este trabalho objetivou a obtenção de compostos de inclusão por diferentes técnicas para hidroclorotiazida (HTZ), cloridrato de pioglitazona (PIO) e claritromicina (CLA), com a finalidade de aumentar a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade desses fármacos. Os compostos de inclusão foram caracterizados por análise térmica, espectroscopia de absorção na região de infravermelho, difração de raios  $X$  em pó, microscopia eletrônica de varredura, análise de tamanho de partícula, estudos de dissolução, ressonância magnética nuclear e avaliados quanto às atividades antimicrobiana *in vitro* (CLA: $\beta$ CD) e diurética (HTZ: $\beta$ CD) em modelos experimentais *in vivo*. Os resultados obtidos para os compostos de inclusão preparados com os três fármacos permitiram confirmar e determinar as interações hóspede-hospedeiro. HTZ formou compostos de inclusão com a  $\beta$ CD na proporção molar 1:1, e os resultados obtidos mostraram que o método de atomização por leito fluidizado foi promissor. Os resultados *in vivo* de atividade diurética demonstraram maior atividade para o composto de inclusão quando comparado ao fármaco livre. Esse resultado foi suportado pelos resultados de dissolução intrínseca, uma vez que os compostos apresentaram maior solubilidade frente ao fármaco livre. PIO formou compostos de inclusão na proporção molar de 1:1 com  $\beta$ -ciclodextrina e com HP $\beta$ -ciclodextrina. Os mesmos apresentaram solubilidade muito superior à da PIO livre. O aumento da solubilidade pode ser atribuído ao fenômeno de inclusão e também ao processo de amorfização promovido pela técnica de *spray drying*. CLA formou compostos proporção molar de 1:1 e 1:4 e os resultados de análise térmica demonstraram que a técnica de liofilização foi mais efetiva. Porém os estudos de dissolução em tampão mostraram perfis de solubilidade muito semelhante para os compostos obtidos, independente da técnica utilizada. Os resultados de atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* mostraram um aumento significativo da atividade antimicrobiana da claritromicina incluída quando comparada ao fármaco livre. Portanto, as ciclodextrinas tiveram um papel

fundamental no aumento da solubilidade dos fármacos como também da melhoria da atividade diurética e antimicrobiana de HTZ e CLA, respectivamente.

Palavras chave: composto de inclusão, hidroclorotiazida, pioglitazona, claritromicina, 2D-ROESY RMN, FTIR, Análise térmica, difração de raios-X de pó, atividade, dissolução intrínseca e avaliação da atividade diurética.

## Abstract

Medicine is a pharmaceutical product with prophylactic, curative, palliative or diagnostic purposes. It is necessary to know its physical and chemical characteristics in order to establish its self-assurance and effectiveness. Among these characteristics, the dissolution rate is a limiting step for the drug absorption. Currently, about 33% of marketed drugs have problems of dissolution. The pharmaceutical industry uses strategies to increase the solubility of drugs and hence its rate of dissolution and bioavailability. One strategy is the use of cyclodextrins, a class of pharmaceutical excipients that is economically and technically viable. This study aimed to obtain inclusion compounds with different techniques for the hydrochlorothiazide (HTZ), pioglitazone hydrochloride (PIO) and clarithromycin (CLA) in order to increase the solubility and the bioavailability of these drugs. The inclusion compounds were characterized by thermal analysis, infrared spectroscopy, X-ray diffraction powder, scanning electron microscopy, particle size analysis, dissolution studies, nuclear magnetic resonance and were evaluated for *in vitro* antimicrobial activity (CLA:βCD) and *in vivo* diuretic activity (HTZ:βCD). The results obtained for the prepared inclusion compounds with the three drugs confirmed and determined host-guest interactions. HTZ formed inclusion compounds with βCD in a 1:1 molar ratio, and the results showed that the method of fluid bed by atomization was promising. Results *in vivo* of diuretic activity showed greater activity for the inclusion compound when compared to free drug. This result was supported by the results of intrinsic dissolution, since the compounds showed greater solubility when compared with the free drug. PIO formed inclusion compounds in the molar ratio of 1:1 with β-cyclodextrin and HPβ-cyclodextrin. They had much higher solubility than PIO free. Increased solubility can be attributed to the inclusion phenomena and also to the process of amorphization promoted by spray drying technique. CLA formed a compound in molar ratio of 1:1 and 1:4 and the results of thermal analysis showed that the freeze-drying technique was more effective. However the dissolution studies in buffer showed very similar solubility profiles for the compounds obtained, regardless of the technique used. *In vitro* results of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* showed a significant increase in antimicrobial activity of included clarithromycin included when compared with free drug. Therefore, cyclodextrins play a key role on the increasing of the solubility of drugs as well as on the improving of the diuretic and antimicrobial activities of HTZ and CLA, respectively.

Keywords: inclusion compound, hydrochlorothiazide, pioglitazone, clarithromycin, Roesy 2D-NMR, FTIR, thermal analysis, X-ray diffraction powder, activity, intrinsic dissolution, and evaluation of diuretic activity.

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Representação esquemática da dinâmica dos processos de dissolução e absorção das formas farmacêuticas de uso oral.	3
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura da ciclodextrina	7
<b>FIGURA 3</b>	Representação esquemática das Ciclodextrinas	7
<b>FIGURA 4</b>	Substituintes dos hidrogênios das hidroxilas da ciclodextrina	8
<b>FIGURA 5</b>	Representação esquemática do processo de equilíbrio que descreve a interação entre um fármaco e a ciclodextrina	10
<b>FIGURA 6</b>	Representação esquemática do processo de absorção sistêmico a partir da liberação do fármaco do complexo de ciclodextrina através de uma membrana biológica da presença de um agente competidor	11
<b>FIGURA 7</b>	Fórmula estrutural da Hidroclorotiazida	14
<b>FIGURA 8</b>	Fórmula estrutural do cloridrato de pioglitazona	16
<b>FIGURA 9</b>	Prevalência mundial do diabetes e projeção de aumento até 2030	16
<b>FIGURA 10</b>	Fórmula estrutural da claritromicina	18
<b>FIGURA 11</b>	Representação esquemática da administração da HTZ e composto de inclusão obtido pela técnica de leite fluidizado nos ratos Wistar.	39
<b>FIGURA 12</b>	Espectros de absorção na região do infravermelho para hidroclorotiazida (HTZ), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura físicos (MF), compostos de inclusão obtidos pelas técnicas <i>spray drying</i> (SD), liofilização (LIOF), leite fluidizado (LF)	44
<b>FIGURA 13</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz) da HTZ em $\text{D}_2\text{O}$	45
<b>FIGURA 14</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz do composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtido pela técnica de liofilização (LF) em $\text{D}_2\text{O}$ .	47
<b>FIGURA 15</b>	Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica liofilização (LIOF) (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	48
<b>FIGURA 16</b>	Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica <i>spray drying</i> (SD) (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )	48

- 
- FIGURA 17** Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica leito fluidizado (LF) (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 49
- FIGURA 18** Difratoograma de Raios-X de pó para hidroclorotiazida (HTZ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF). 50
- FIGURA 19** Curvas DSC para hidroclorotiazida (HTZ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) mistura física (MF), e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF). 52
- FIGURA 20** Curvas de TG/DTG para HTZ,  $\beta$ CD, mistura física (MF), e compostos obtidos por liofilização (LIOF), spray drying (SD), leito fluidizado (LF). 54
- FIGURA 21** Fotomicrografias de HTZ, e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de *spray drying* (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF), aumento de 5000 x. 55
- FIGURA 22** Distribuição do tamanho da partícula para HTZ e seus compostos de inclusão obtidos pelas diferentes técnica, liofilização (LIOF), spray drying (SD) e leito fluidizado (LF) 56
- FIGURA 23** Dissolução intrínseca para hidroclorotiazida e compostos de inclusão obtidos spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF) 58
- FIGURA 24** Perfil de dissolução para hidroclorotiazida (HTZ) e formulações preparadas a partir dos compostos de inclusão obtidos por spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF) (O número de amostras foi igual a 4) 60
- FIGURA 25** Volume urinário de ratos Wistar após administração oral de 1 mL água de destilada (controle), uma dose de HTZ (10mg.kg<sup>-1</sup>) e composto de inclusão LF (38 mg.kg<sup>-1</sup>), foi mensurado em 2, 4, 8, 24, 32 e 48 h. Os valores acumulados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M de doze ratos em cada grupo. . # estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ, p <0,05. 62

- 
- FIGURA 26** Volume de sódio excretado na urina de ratos Wistar após administração oral de 1 mL de água destilada (grupo controle) de uma dose de HTZ (10 mg.kg<sup>-1</sup>) e composto de inclusão LF (38 mg.kg<sup>-1</sup>), foi mensurado em 2, 4, 8, 24, 32 e 48 h Os valores são apresentados como média ± SEM de doze ratos em cada grupo. # estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ, p <0,05. 62
- FIGURA 27** A osmolalidade na urina de ratos wistar após administração oral de água destilada (grupo controle), de uma dose de HTZ (10 mg.kg<sup>-1</sup>) e composto de inclusão LF (38 mg.kg<sup>-1</sup>). Os valores acumulados são apresentados como média ± SEM de doze ratos em cada grupo. # estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ, p <0,05. 63
- FIGURA 28** Espectros de absorção na região do infravermelho para cloridrato de pioglitazona (PIO), β – ciclodextrina (βCD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica *spray drying* (SD). 67
- FIGURA 29** Espectros de absorção na região do infravermelho para cloridrato de pioglitazona (PIO), HPβ–ciclodextrina (βCD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica *spray drying* (SD). 68
- FIGURA 30** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, D<sub>2</sub>O) para cloridrato de pioglitazona 69
- FIGURA 31** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (400MHz, D<sub>2</sub>O) para cloridrato de pioglitazona 70
- FIGURA 32** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, D<sub>2</sub>O) para o composto PIO:βCD 71
- FIGURA 33** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, D<sub>2</sub>O) para o composto PIO:HPβCD 72
- FIGURA 34** Mapa de contorno ROESY (400MHz, D<sub>2</sub>O) para o composto PIO:βCD 74
- FIGURA 35** Mapa de contorno ROESY (400MHz, D<sub>2</sub>O) para o composto PIO:HPβCD 75
- FIGURA 36** Difratoograma de Raios-X de pó para cloridrato de pioglitazona (PIO), β- ciclodextrina (βCD), mistura física (MF), e composto de inclusão obtido pela técnica de *spray drying* (SD). 76

---

<b>FIGURA 37</b>	Difratograma de Raios-X de pó para cloridrato de pioglitazona (PIO), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e composto de inclusão obtido pela técnica de <i>spray drying</i> (SD).	77
<b>FIGURA 38</b>	Curvas DSC para PIO, $\beta$ CD, mistura física (MF) e o composto preparado por <i>spray drying</i> (SD)	78
<b>FIGURA 39</b>	Curvas DSC para PIO, HP $\beta$ CD, mistura física (MF) e composto de inclusão preparado por <i>spray drying</i> (SD)	79
<b>FIGURA 40</b>	Curvas de TG/DTG para PIO, $\beta$ CD, mistura física (MF), e composto obtido por <i>spray drying</i> (SD).	80
<b>FIGURA 41</b>	Curvas de TG/DTG para PIO, HP $\beta$ CD, mistura física (MF), e composto obtido por <i>spray drying</i> (SD).	82
<b>FIGURA 42</b>	Fotomicrografias para cloridrato de pioglitazona e os compostos de inclusão preparados por <i>spray drying</i> (SD) com $\beta$ CD e HP $\beta$ CD	83
<b>FIGURA 43</b>	Perfil de Dissolução para cloridrato de pioglitazona e os compostos de inclusão preparados por <i>spray drying</i> (SD) com $\beta$ CD e HP $\beta$ CD em tampão KCl pH = 2,0..	84
<b>FIGURA 44</b>	Espectros de absorção na região do infravermelho para claritromicina (CLA), $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica <i>spray drying</i> (SD), nas proporções 1:1 e 1:4	88
<b>FIGURA 45</b>	Espectros de absorção na região do infravermelho para claritromicina (CLA), $\beta$ - ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções 1:1 e 1:4	89
<b>FIGURA 46</b>	Estrutura da Claritromicina	90
<b>FIGURA 47</b>	RMN de $^1\text{H}$ para a Claritromicina, 400 MHz (DMSO- $d_6$ ).	91
<b>FIGURA 48</b>	Mapa de contornos de ROESY para o sistema claritromicina/ $\beta$ CD (400 MHz, DMSO- $d_6$ )	93
<b>FIGURA 49</b>	Seções expandidas do mapa de contornos de ROESY para o sistema claritromicina/ $\beta$ -CD (400 MHz, DMSO- $d_6$ ). <i>Em destaque são mostradas correlações indicativas de acoplamento dipolar em regiões de sobreposição de sinais.</i>	93

- FIGURA 50** Espectros de HR- DOSY para o complexo CLA: $\beta$ CD (1:4) a 400 MHz, D<sub>2</sub>O. 95
- FIGURA 51** Difratoograma de Raios-X de pó para claritromicina (CLA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e os compostos de associação obtidos pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4. 96
- FIGURA 52** Difratoograma de Raios-X de pó para claritromicina (CLA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e os compostos de associação obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4. 97
- FIGURA 53** Curvas DSC para CLA,  $\beta$ CD, mistura física (MF) e os compostos de associação obtido pela técnica *spray drying* (SD), nas proporções molares 1:1 e 1.4 99
- FIGURA 54** Curvas DSC para CLA,  $\beta$ CD, mistura física (MF) e os compostos de associação obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4. 100
- FIGURA 55** Curvas TG/DTG para CLA,  $\beta$ CD, MF, composto de associação (CLA:  $\beta$ CD) preparado pelos métodos de liofilização e *spray drying* nas proporções molares 1:1e 1:4. 102
- FIGURA.56** Fotomicrografias para claritromicina e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização na proporção molar 1:1 104
- FIGURA 57** Perfil de Dissolução para claritromicina e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4 em tampão acetato de sódio pH 5,0. 105
- FIGURA 58** Perfil de Dissolução para claritromicina e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4 em tampão água. 106

**INDICE DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Sistema para Classificação Biofarmacêutica de Fármacos	4
<b>TABELA 2</b>	Algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas	8
<b>TABELA 3</b>	Valores de deslocamento químicos de alguns sinais de hidrogênios da HTZ e dos compostos de inclusão preparados por diferentes métodos (400 MHz, D <sub>2</sub> O).	46
<b>TABELA 4</b>	Regressão Linear, coeficiente de correlação linear (R) e Eficiência da Dissolução Intrínseca para HTZ e compostos de inclusão obtidos por spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF)*.	58
<b>TABELA 5</b>	Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da PIO e seus respectivos compostos de inclusão em D <sub>2</sub> O a 400MHz.	73
<b>TABELA 6</b>	Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H para a Claritromicina em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz.	91
<b>TABELA 7</b>	Efeito inibidor do produto - diluição em caldo para claritromicina (A), <i>β</i> -ciclodextrina e seus compostos de associação LIOF (1:1 e 1:4) e SD (1:1 e 1:4)	108
<b>TABELA 8</b>	Efeito inibidor do produto, método de recuperação de microrganismos para claritromicina (A), <i>β</i> -ciclodextrina e seus compostos de associação LIOF (1:1 e 1:4) e SD (1:1 e 1:4)	109

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BCS	Sistema de classificação biofarmacêutica de fármacos
CD	Ciclodextrinas
SUS	Sistema único de saúde
WHO	Organização mundial de saúde
$\beta$ CD	$\beta$ -ciclodextrina
HP $\beta$ CD	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
HTZ	Hidroclorotiazida
PIO	Cloridrato de pioglitazona
CLA	Claritromicina
$\delta$	Deslocamento químico
2D	Bi-dimensional
DMSO-D <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DRX	Difratometria de raios-X de pó
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
TG	Termogravimetria
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LIOF	Liofilizado
LF	Leito Fluidizado
SD	Spray drying
MF	Mistura Física
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
TGI	Trato gastrointestinal
UV-vis.	Ultravioleta visível
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
HTZ: $\beta$ CD	Composto de inclusão hidroclorotiazida- $\beta$ -ciclodextrina
PIO: $\beta$ CD	Composto de inclusão cloridrato de pioglitazona- $\beta$ -ciclodextrina
PIO:HP $\beta$ CD	Composto de inclusão cloridrato de pioglitazona- hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
CLA: $\beta$ CD	Composto de inclusão claritromicina- $\beta$ -ciclodextrina

UFC                      Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Ciclodextrinas	7
1.1.1 Uso das ciclodextrinas em formulações farmacêuticas	8
1.2 Métodos de preparo de compostos de inclusão	12
1.2.1 Método de liofilização	12
1.2.2 Método atomização: <i>spray drying</i> e leito fluidizado	12
1.2.3 Métodos de caracterização dos compostos de inclusão	13
1.3 Diurético, anti-hipoglicemiante e antimicrobiano	14
1.3.1 Hidroclorotiazida	14
1.3.2 Cloridrato de pioglitazona	15
1.3.3 Claritromicina	18
Capítulo 2 - Objetivos	20
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
CAPITULO 3 - Material e Métodos	23
3.1 Reagentes	24
3.2 Equipamentos e técnicas de caracterização	27
3.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	27
3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (RMN) e ROESY	27
3.2.3 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	27
3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	27
3.2.5 Difractometria de Raios-X de Pó (DRX)	28
3.2.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta (UV-vis)	28
3.2.7 Liofilização	28
3.2.8 <i>Spray Drying</i>	28
3.2.9 Leito Fluidizado	28
3.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
3.2.11 Tamanho de Partículas por Espalhamento de luz	29
3.2.12 Dissolução	29
3.3 Métodos de preparo dos compostos de inclusão	29
3.3.1 Composto de inclusão entre hidroclorotiazida e $\beta$ -ciclodextrina (HTZ: $\beta$ CD).	30

3.3.2 Composto de inclusão entre cloridrato de pioglitazona e $\beta$ -ciclodextrina (PIO: $\beta$ CD)	31
3.3.3 Composto de inclusão entre cloridrato de pioglitazona e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (PIO:HP $\beta$ CD)	31
3.3.4 Composto de inclusão entre claritromicina e $\beta$ -ciclodextrina (CLA: $\beta$ CD)	31
3.3.5 Composto de inclusão entre claritromicina e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (CLA:HP $\beta$ CD)	31
3.4 Preparo das cápsulas contendo fármacos e cápsulas contendo compostos de inclusão para análises de perfil de dissolução	32
3.4.1 Cápsulas contendo PIO e cápsulas contendo compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD	32
3.4.2 Cápsulas contendo CLA e cápsulas contendo compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD nas proporções molares de 1:1 e 1:4	32
3.4.3 Preparação de formulação farmacêutica sólida de uso oral contendo HTZ: $\beta$ CD.	32
3.5 Estudos de dissolução	33
3.5.1 Hidroclorotiazida pura e composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD	33
3.5.2 Cápsulas de HTZ e compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD - formulação final.	33
3.5.3 Cloridrato de pioglitazona e composto de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD	34
3.5.4 Claritromicina e composto de inclusão CLA: $\beta$ CD e CLA:HP $\beta$ CD	35
3.6 Teste antimicrobiano	36
3.6.1 Determinação da atividade antimicrobiana da CLA e dos compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD obtidos por spray drying e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4.	36
3.6.1.1 Preparação do inóculo do microorganismo	36
3.6.1.2 Diluição das amostras	37
3.6.1.3 Preparação e inóculo das placas de Petri	37
3.6.1.4 Preparação dos tubos com o microorganismo	37
3.6.1.5 Preparação dos inóculos controle	38
3.6.1.6 Resultados	38
3.6.1.7 Avaliação do Resultado	38
3.7 Determinação da atividade diurética do composto de inclusão: HTZ: $\beta$ CD	39
3.7.1 Dosagem de sódio na urina.	40
3.7.2 Osmolalidade na urina	40
Capítulo 4- Resultados e Discussão	
4.1 Hidroclorotiazida, $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de inclusão	42
4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	42

4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear- RMN	44
4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear dos Compostos de Inclusão Hidroclorotiazida/ $\beta$ - Ciclodextrina	46
4.1.2.2 ROESY.	47
4.1.3 Difractometria de raios-X de pó	49
4.1.4. Analise Térmica	51
4.1.4.1- Curvas de DSC	51
4.1.4.2 – Curvas de TG/DTG	53
4.1.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura	55
4.1.6 - Análise de Tamanho de Partículas	55
4.1.7 – Estudos de Dissolução	57
4.1.7.1 - Dissolução intrínseca	57
4.1.7.2 – Estudos da dissolução em cápsulas de HTZ e compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD	59
4.1.8. Ensaio Biológico	61
4.2 Cloridrato de pioglitazona, $\beta$ -ciclodextrina, Hidropril- $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de inclusão	65
4.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	65
4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear para os compostos de inclusão	68
4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para Cloridrato de Pioglitazona	68
4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para os compostos de inclusão	70
4.2.2.3 ROESY	73
4.2.3 Difractometria de Raios-X de Pó	75
4.2.4 Analise Térmica	77
4.2.4.1 Curvas de DSC	77
4.2.4.2 Curvas de TG/DTG	79
4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	82
4.2.6 Perfil Dissolução	83
4.3 Claritromicina, $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de associação	86
4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	86
4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear para os complexos formados ente claritromicina e $\beta$ -ciclodextrina	89
4.3.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN) de $^1\text{H}$ ) para Claritromicina	89
4.3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para os complexos claritromicina e $\beta$ -ciclodextrina	92
4.3.2.3 ROESY e DOSY	92

4.3.3 Difractometria de Raios-X de Pó	95
4.3.4 Análise Térmica	98
4.3.4.1 Curvas de DSC	98
4.3.4.2 Curvas de TG/DTG	101
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	103
4.3.6 Perfil dissolução	104
4.3.7 Atividade antimicrobiana da claritromicina e de seus respectivos compostos de associação	107
Capítulo 5 Conclusões	110
Referências bibliográficas	114
Anexos	
Anexo 1	125

Capítulo 1

Introdução

---

O medicamento é um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É um produto que tem um alto valor agregado, tanto do ponto de vista de desenvolvimento tecnológico como de conhecimento aplicado. Para que um medicamento chegue ao mercado é necessário que se apresentem às agências regulatórias estatais dados de segurança e eficácia (BRASIL, 1973).

A eficácia e segurança de um fármaco estão diretamente relacionadas à sua biodisponibilidade. Para isto é necessário que o fármaco seja disponibilizado em tempo razoável no seu sítio de absorção.

Sendo assim, a via de administração do medicamento é um fator importantíssimo a ser considerado, sendo a via oral a de primeira escolha por ser mais confortável e de mais fácil administração, além de apresentar maior estabilidade física, química e microbiológica. Por isso mais de 90% dos medicamentos são comercializados na forma farmacêutica sólida de uso oral (AUTON, 2001; WATERBEEMD *et al.*, 2008; KRISHNA e YU, 2009; JANSEN, 2010).

No Brasil os medicamentos alopáticos de origem sintética são divididos em três categorias quanto ao seu registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): medicamentos novos, medicamentos similares e medicamentos genéricos.

Os medicamentos novos têm que apresentar, no momento do registro, dados clínicos de segurança e eficácia, sendo comercializados como referência para os demais. Já os medicamentos genéricos e similares são cópias dos medicamentos de referência e devem apresentar provas de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade no caso dos genéricos e biodisponibilidade relativa para os similares, sempre em relação aos medicamentos de referência (ANVISA, 2011).

Os estudos de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade buscam provar que os medicamentos genéricos e similares apresentam segurança e eficácia semelhantes ao medicamento de referência, ou seja, apresentam o perfil de concentração similar (TAKAGI *et al.*, 2006).

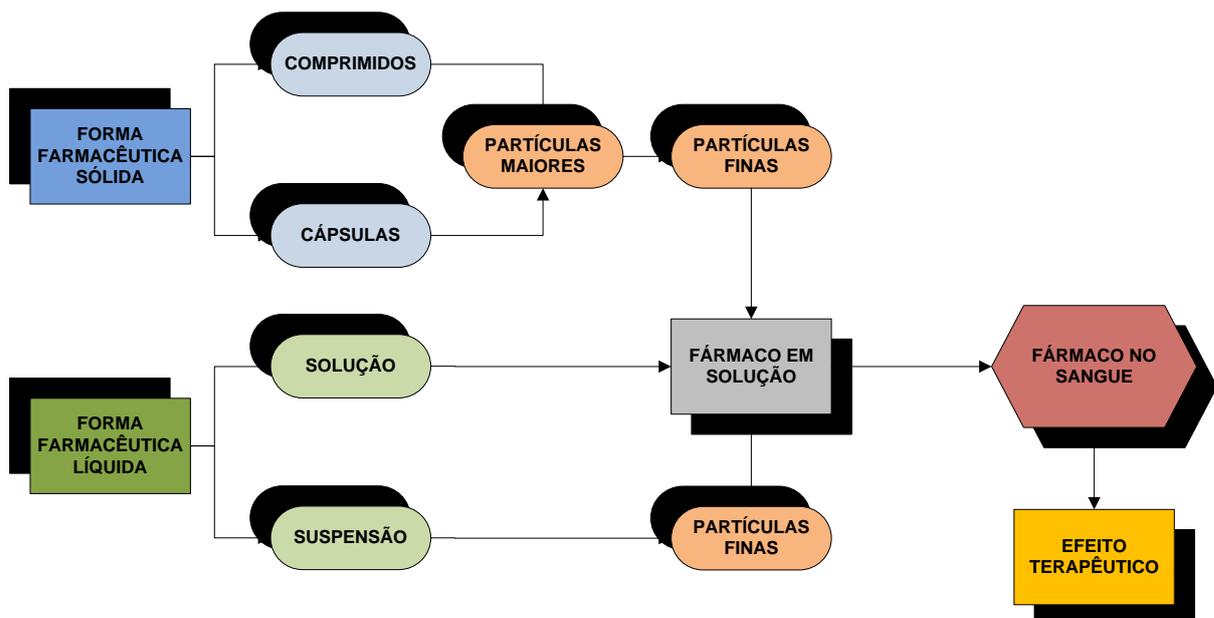
Independentemente da categoria à qual medicamento esteja pleiteando registro junto à ANVISA, é necessário que o mesmo seja seguro e eficaz, e para isto é de fundamental importância que seja realizado o estudo de pré-formulação durante o seu desenvolvimento, a fim de garantir o seu sucesso.

Por isso torna-se imprescindível o conhecimento profundo das características físico-químicas do fármaco, dos excipientes que compõem a formulação final do medicamento,

bem como dos fatores tecnológicos envolvidos na sua produção. Nas últimas décadas, estudos têm mostrado a importância das características físico-químicas do fármaco, da formulação e/ou técnica de fabricação como fator determinante na absorção do fármaco, conseqüentemente, em sua biodisponibilidade (CONSIGLIERI e STORPIRTIS, 2000).

As propriedades físico-químicas do fármaco, forma (sal, ácido livre, base livre) e forma física (amorfos, polimorfos, tamanho de partícula) representam um importante papel para a dissolução. Se essa fase é limitante, a velocidade de dissolução é controlada pela solubilização intrínseca do fármaco, como é o caso da maior parte dos ativos pouco solúveis (BROW *et al.*, 2004; STEGEMANNA *et al.*, 2007).

Quando um fármaco é administrado na forma farmacêutica sólida de uso oral, é necessário que ocorra a sua dissolução no meio de absorção, o que é condição essencial para a ocorrência da permeação e alcance da circulação sistêmica, conforme demonstrado na FIGURA 1. Diante disso, o conhecimento e o controle dos fatores que alteram a dissolução dos fármacos são fundamentais para garantir a qualidade dos medicamentos disponibilizados à população (NERY *et al.*, 2008). Na área farmacêutica essas características podem ser verificadas *in vitro* através do perfil de dissolução, por meio da quantificação do fármaco dissolvido, e *in vivo* pela sua concentração plasmática, ambos em função do tempo. Os dados *in vivo* permitem determinar a biodisponibilidade do fármaco (POLI, CÉSAR e AMIDON, 1996).



**FIGURA 1.** Representação esquemática da dinâmica dos processos de dissolução e absorção das formas farmacêuticas de uso oral.

Por outro lado a permeação intestinal do fármaco pode também representar um fenômeno limitante no processo de absorção, principalmente para formas farmacêuticas sólidas de uso oral (POLI, CÉSAR e AMIDON, 1996). Fármacos pouco solúveis em água ou com solubilidade pH dependente são altamente afetados pelas mudanças pós-prandiais do trato gastrointestinal (TGI), podendo apresentar diferenças significativas na sua biodisponibilidade (MACHERAS e ARGYRAKIS, 1997; CHARMAN *et al.*, 1997). A velocidade e a extensão da absorção de um fármaco podem ser alteradas devido à sua lipofilia, e principalmente, pelo estado de ionização e/ou tamanho de partículas (AMIDON *et al.*, 1995; AUNGST e SHEN, 1986).

Amidon *et al.* (1995) catalogaram as substâncias farmacêuticas em quatro grupos de acordo com suas propriedades de solubilidade e permeabilidade. O conceito de solubilidade associado ao de permeabilidade no trato gastrointestinal é a essência para o Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Fármacos (BCS) proposta por eles. A TABELA 1, a seguir, apresenta a Classificação Biofarmacêutica proposta por Amidon *et al.* (1995).

**TABELA 1 – Sistema para Classificação Biofarmacêutica de Fármacos**

<b>Variáveis relacionadas ao fármaco</b>			
	<b>Solubilidade</b>	<b>Permeabilidade</b>	
Classe I	Alta	Alta	Geralmente são bem absorvidos
Classe II	Baixa	Alta	A absorção é limitada à dissolução
Classe III	Alta	Baixa	A absorção é limitada pela permeação
Classe IV	Baixa	Baixa	Muito baixa biodisponibilidade oral

Esta classificação baseia-se na solubilidade da maior dose do fármaco terapeuticamente aceita em até 250 mL de meio aquoso numa faixa de pH fisiologicamente relevante (de 1 a 7,5) e na permeabilidade celular desta substância ativa, permitindo a subdivisão dos fármacos nas quatro classes distintas. Portanto, pode haver divergência entre a classificação físico-química de solubilidade de determinado fármaco e sua Classificação Biofarmacêutica, uma vez que a substância pode ser considerada não solúvel do ponto de vista físico-químico e de alta solubilidade com relação à sua Classificação Biofarmacêutica, uma vez que esta é obtida levando-se em consideração a dose administrada (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000; MARTINEZ e AMIDON, 2002; JOHNSON, 2006; YU, CARLIM e AMIDON, 2004).

Desde que o Sistema de Classificação Biofarmacêutica foi introduzido em 1995 no âmbito internacional, seu uso vem sendo adotado para que os testes de dissolução *in vitro* sejam usados para estabelecer correlações com a bioequivalência no caso de fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (COOK e SHENOY, 2003; WU e BENET, 2005). Importante mencionar que algumas Agências Regulatórias já adotaram o critério das isenções de testes de bioequivalência (bioisenções) para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, cujos fármacos pertencem à classe I do BCS, ou seja, fármacos altamente solúveis e altamente permeáveis (FDA, 2000).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica pretende correlacionar a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo*. O conhecimento da solubilidade e permeabilidade gastrointestinal dos fármacos se torna de grande valia, uma vez que esses parâmetros controlam a taxa e a extensão da absorção (AMIDON *et al.*, 1995).

A correlação *in vitro in vivo* (CIVIV) refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre uma propriedade do fármaco e seu efeito biológico, administrado em uma determinada forma farmacêutica, e uma propriedade ou característica físico-química dessa mesma formulação. As propriedades biológicas normalmente empregadas são um ou mais parâmetros farmacocinéticos, como  $c_{max}$  (concentração máxima atingida pelo fármaco no plasma), ASC (área sob a curva de concentração plasmática do fármaco em função do tempo) e  $T_{max}$  (tempo no qual  $c_{max}$  é alcançada), obtidos após a administração de forma farmacêutica aos indivíduos participantes do ensaio de biodisponibilidade. Por sua vez, a propriedade físico-química mais utilizada refere-se à cinética de dissolução *in vitro* da forma farmacêutica, que fornecerá dados sobre a porcentagem de fármaco dissolvido no meio, em relação ao declarado, em função do tempo (ROSA, 2005).

Diante disto alguns modelos de correlação *in vitro in vivo*, objetivando a correlação entre os dados obtidos *in vitro* e o comportamento *in vivo* de fármacos, tem sido propostos (KATORI, AOYAGI e TERAU, 1995; EDDINGTON *et al.*, 1998; BALLAN *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2001).

O grau de correlação CIVIV depende da dissolução do fármaco, sua permeação intestinal e da fração da dose absorvida (MACHERAS e ARGYRAKIS, 1997). A CIVIV apresenta grande relevância ética, pois permite mimetizar os testes em voluntários sadios, podendo ser utilizados nos processos iniciais de aprovação de registro de novos medicamentos e/ou para isentar da repetição dos estudos de bioequivalência (FDA, 2000).

Por isso a Classificação Biofarmacêutica tornou-se uma ferramenta determinante para os estudos de pré-formulação na tentativa de aproximar ao máximo os fármacos da Classe I, ou seja, a classe ideal no que se refere à solubilização e permeação no TGI. Os

medicamentos que são pouco solúveis e/ou pouco permeáveis devem ser aprimorados de forma que problemas na velocidade de dissolução e permeabilidade sejam minimizados garantindo maior biodisponibilidade oral dos fármacos quando administrados.

Assim sendo, dependendo da tecnologia empregada, um fármaco de Classe II com problemas de dissolução poderia ser reclassificado como de Classe I, caso estes fossem contornados. O mesmo aconteceria com os de Classe IV, que poderiam migrar para a Classe III. Em todas estas situações apenas o parâmetro de dissolução foi melhorado.

Apesar da solubilidade dos fármacos poder ser melhorada, sua permeabilidade intrínseca é mais difícil de ser modificada, impedindo muitas vezes ganhos efetivos em sua absorção. A permeabilidade pode aumentar apenas nas situações onde a taxa de dissolução, quando elevada, propicia maior taxa de permeação (LOFTSSON, 2002).

Fridriksdóttir *et al.* (1996) estudaram o  $\beta$ -estradiol, um fármaco que, apesar de ser classificado como de Classe I, apresenta uma biodisponibilidade oral reduzida (da ordem de 5%) em função apenas da metabolização de primeira passagem que acontece no fígado. Para reduzir a metabolização de primeira passagem, a administração sublingual foi sugerida, mas apresentou o inconveniente da reduzida solubilidade do fármaco em função da menor quantidade de líquido disponível para dissolução na cavidade oral, sendo o mesmo reclassificado como sendo de Classe II nesta situação. Sendo assim, o fármaco foi complexado à  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) garantindo melhor solubilidade do complexo em relação ao fármaco isolado, retornando-o novamente à Classe Biofarmacêutica I.

Dessa forma foi viabilizada a administração oral do  $\beta$ -estradiol, na forma de comprimido sublingual, onde a solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade, em conjunto, foram elevadas. Este tem sido o desafio da indústria farmacêutica, que é tentar aumentar a solubilidade aparente de compostos lipofílicos sem diminuir sua potência otimizada (BRANCHU *et al.*, 2007).

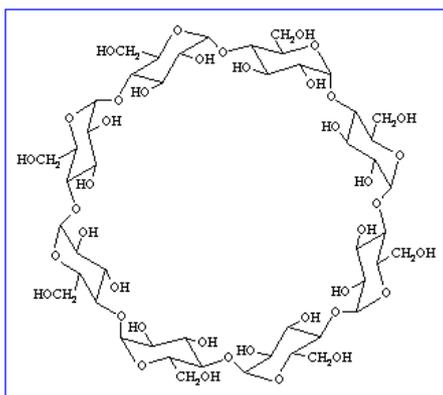
Neste contexto o objetivo na área de desenvolvimento de fármacos é ter medicamentos mais seguros e eficazes num tempo menor, o que faz com que a área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) da indústria farmacêutica tenha um grande desafio pela frente, pelo fato de 40% dos fármacos candidatos a serem lançados no mercado apresentarem baixa solubilidade em meio aquoso, além daqueles que são atualmente comercializados apresentarem também problemas de dissolução, o que representa mais de 33% dentre os medicamentos de referência, genéricos e similares no mercado nacional (KASSIM *et al.*, 2004).

Diante disto a indústria tem utilizado algumas estratégias para melhorar a insolubilidade dos fármacos em meio aquoso e, conseqüentemente, sua taxa de dissolução.

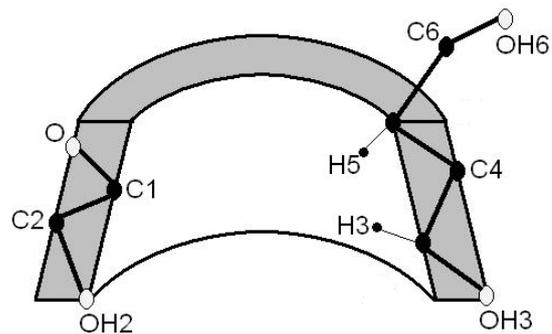
Técnicas como micronização, dispersão molecular, incorporação de tensoativos, transformação da fase sólida em formas polimorfas ou amorfas, uso de nanopartículas, microemulsões, dispersões sólidas, formação de sais e formação de complexos solúveis em água. Cumprindo este requisito, podemos citar as ciclodextrinas, que constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos (FDA, 2000; NERY *et al.*, 2008; LOFTSSON e BREWSTER, 1996; LOFTSSON *et al.*, 2007; RAJENDRAKUMAR *et al.*, 2005).

### 1.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos, contendo um mínimo de seis unidades de D-(+)-glicopirranose, unidas por ligações do tipo ( $\alpha$ -1,4), sendo a sua configuração tridimensional mais estável apresentando-se no formato de um cone truncado, representada pelas FIGURAS 2 e 3.



**FIGURA 2** - Estrutura da ciclodextrina



**FIGURA 3** - Representação esquemática das Ciclodextrinas

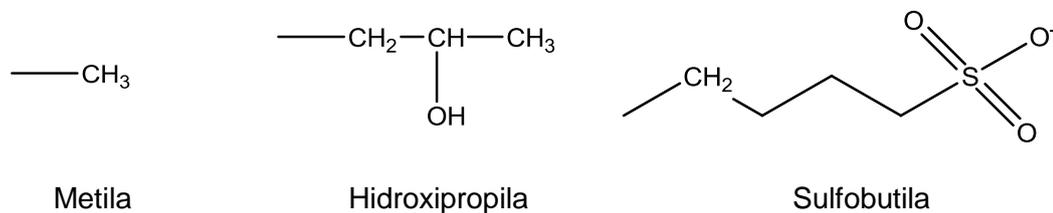
Elas apresentam uma cavidade interna apolar, que é hidrofóbica, devida ao posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades glicopirranose, e uma superfície externa hidrofílica devido à posição ocupada pelas hidroxilas primárias unidas ao átomo de carbono C6 e as hidroxilas secundárias ligadas aos átomos de carbonos C2 e C3. A presença dessa cavidade hidrofóbica torna as ciclodextrinas capazes de alojar uma molécula convidada ou parte da molécula, formando assim compostos de inclusão (DUCHENE *et al.*, 1990; FROMMING, 1993).

As ciclodextrinas mais comuns são  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas com 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. Na Tabela 2 estão representadas suas propriedades físico-químicas.

**TABELA 2** - Algumas propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

	Ciclodextrinas		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Número de monômeros de glicopirranose	6	7	8
Massa molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume aproximado da cavidade por mol (mL)	104	157	256
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

Existem também ciclodextrinas modificadas de grande interesse tecnológico, sintetizadas a partir da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas ligadas ao carbono 6 por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila principalmente (LOFTSON, 1996; THOMPSON, 1997) (FIGURA 4).

**FIGURA 4** - Substituintes dos hidrogênios das hidroxilas da ciclodextrina

### 1.1.1 Uso das ciclodextrinas em formulações farmacêuticas

As ciclodextrinas têm sido objeto de muito estudo na área farmacêutica, principalmente com o objetivo de aumento de solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de fármacos. A literatura confere também às ciclodextrinas a habilidade de reduzir amargor e odor de fármacos, diminuir ou até mesmo eliminar irritações oculares ou gastrointestinais, prevenir a evaporação das moléculas hóspedes, converter substâncias voláteis e líquidas em formulações sólidas e prevenir interações e incompatibilidade (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; UEKAMA, 2004). Existem estudos de associações de ciclodextrinas

com mais de 515 fármacos e os medicamentos comercializados no mercado mundial já passam de 30 (LOFTSSON *et al.*, 2007).

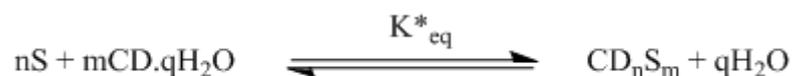
O uso de ciclodextrinas para preparo de formulações farmacêuticas parte do princípio de que as propriedades físico-químicas dos fármacos após formação de compostos de inclusão podem ser modificadas. Antes de preparar um complexo entre um fármaco e uma ciclodextrina devem-se conhecer as propriedades físico-químicas da molécula hóspede. Tais características são de grande importância, uma vez que as mesmas definem a viabilidade ou não do complexo como também a sua estabilidade (DENADAI *et al.*, 2006).

Deve-se planejar a viabilidade da inclusão baseando-se no tamanho, geometria e polaridade da molécula a ser hospedada. Caso esta inclusão seja viável é preciso determinar se há inserção total ou parcial da molécula hóspede na cavidade apolar da ciclodextrina. Moléculas de baixa massa molar podem se inserir totalmente, ao passo que as de massa molar grande serão parcialmente inseridas (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990).

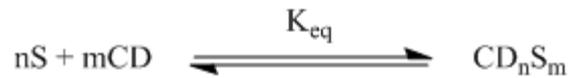
A capacidade das ciclodextrinas de formar compostos de inclusão baseia-se na versatilidade de suas propriedades físicas e químicas, as quais possibilitam interações intermoleculares do tipo hóspede-hospedeiro com suas moléculas sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as espécies (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1990; PAULA *et al.*, 2005).

Pode se dizer que a inclusão do fármaco na cavidade da ciclodextrina baseia-se nos princípios da química supramolecular, na qual a interação entre os dois componentes em um arranjo organizado é feita por forças intermoleculares fracas, tipo Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (DUCHÊNE *et al.* 1990; SAENGER, 1980; PAULA *et al.*, 2005).

A formação de compostos de inclusão em solução ocorre praticamente em duas etapas: primeiramente a saída das moléculas de água do interior da cavidade e posteriormente verifica-se a inclusão da molécula ou parte desta na cavidade da ciclodextrina (SAENGER, 1980; LOFTSSON e BREWSTER, 1996). Tal fenômeno pode ser descrito pelas Equações a seguir e pela FIGURA 5.



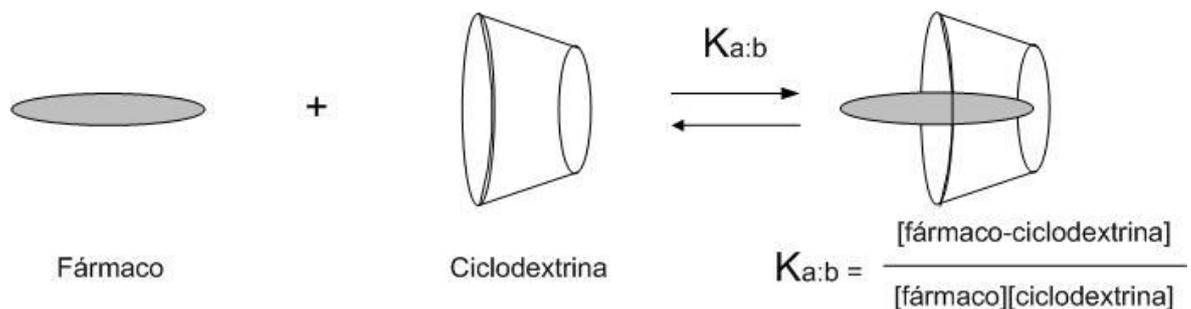
ou de forma resumida



sendo:

- “S” a molécula hóspede
- CD a ciclodextrina,
- $CD_nS_m$  o composto de inclusão,
- $m$ ,  $n$  e  $q$  os coeficientes estequiométricos da reação
- $K_{eq}$  e  $K_{eq}^*$  as constantes de equilíbrio do processo

As constantes de equilíbrio do processo  $K_{eq}$ , podem levar em conta ou não as moléculas de água envolvidas no processo.

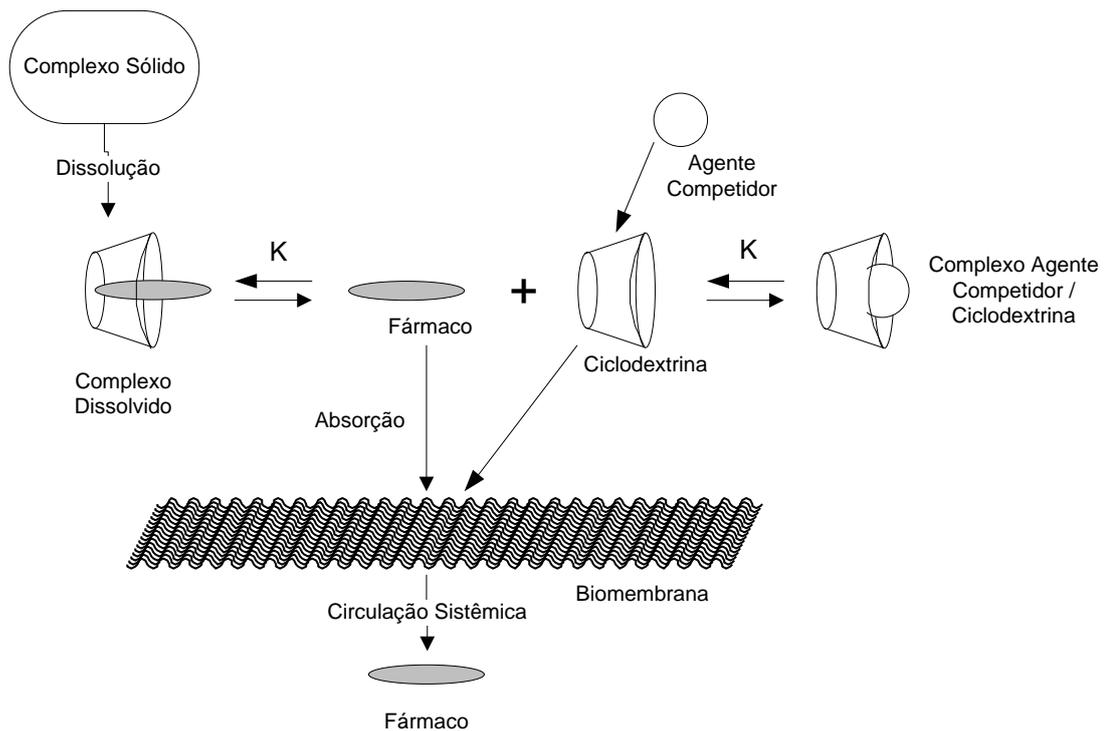


**FIGURA 5** - Representação esquemática do processo de equilíbrio que descreve a interação entre um fármaco e a ciclodextrina (LOFTSSON e BREWSTER, 1996)

Quando um composto de inclusão é administrado, independente da via, ocorre dissociação do complexo liberando a molécula hóspede. Conforme descrito na equação acima, haverá um equilíbrio dinâmico entre as formas livres da ciclodextrina, do fármaco e do complexo de inclusão, regidas pela constante de formação do complexo.

Ocorrendo a inclusão na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, a liberação depende da quantidade de líquido que circunda o complexo, e se dá pelo processo de diluição do complexo ou pelo deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas, endógenas no organismo, conforme pode ser observado na FIGURA 6, e que possuam maior afinidade com a cavidade (LOFTSSON e DUCHENE, 2007).

Ocorrendo a dissociação, o fármaco encontra-se na forma livre e apto para que seja absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não consegue atravessar as membranas devido à característica hidrofílica da ciclodextrina, o que justifica a sua baixa toxicidade. Por outro lado a ciclodextrina dissociada poderá remover lipoproteínas das membranas, modificando as propriedades de transporte das mesmas e facilitando a absorção do fármaco.



**FIGURA 6** - Representação esquemática do processo de absorção sistêmica a partir da liberação do fármaco do complexo de ciclodextrina através de uma membrana biológica na presença de um agente competidor (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE 1998)

Dessa forma, a complexação de fármacos com ciclodextrinas pode aumentar a solubilidade de moléculas pouco solúveis em água. A elevação dessa solubilidade está diretamente relacionada ao aumento da biodisponibilidade para os fármacos classe II e IV, o que torna os compostos de inclusão promissores pelo fato de possibilitarem a redução de dose, das reações adversas e eventualmente dos custos do tratamento (DAVIS e BREWSTER, 2004; SZEJTLI, 2004; REBECA *et al.*, 2007).

## 1.2 Métodos de preparo de compostos de inclusão

Existem vários métodos para a preparação dos compostos de inclusão, podendo-se citar a liofilização, pasta, mistura física, co-precipitação, atomização, fluidização supercrítica, dentre outros. Os mesmos já são descritos em literatura desde 1975 (LIN *et al.*, 1989). Entretanto, dentre essas técnicas, destaca-se a técnica de atomização, devido à maior complexação das moléculas e menor tempo de preparo dos compostos. A seguir encontram-se descritas as técnicas utilizadas no preparo dos compostos de inclusão deste trabalho.

### 1.2.1 Método de liofilização

Consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Geralmente se obtém pós secos, amorfos e com elevado grau de interação fármaco-ciclodextrinas. Apresenta como desvantagens o longo tempo de processamento e as más características de fluxo do material obtido (CARRIER, MILLER e AHMED, 2007).

### 1.2.2 Método atomização: *spray drying* e leito fluidizado

A técnica de atomização tem sido citada na literatura como um processo de preparação de compostos de inclusão de fármacos em ciclodextrinas mais versátil que as outras técnicas de secagem (PILCER *et al.*, 2008). Uma de suas vantagens é a formação direta de precipitados sólidos durante o processo. Esta técnica ainda oferece um processo de passo único, que tem a vantagem de redução nas etapas de preparação, levando a uma diminuição no tempo necessário ao processamento e em seu custo, além de propiciar um melhor controle inclusive o monitoramento de características físicas das partículas obtidas.

Atualmente este método é um dos mais empregados para produzir compostos de inclusão a partir de uma solução. A mistura do sistema e a rápida eliminação de água propiciam uma eficiência de complexação elevada. Além disso, estas técnicas permitem controlar o tamanho de partículas, característica fundamental, por exemplo, para obtenção de pós para administração pulmonar. O baixo rendimento e o estresse térmico são algumas de suas limitações (CABRAL-MARQUES e ALMEIDA, 2009).

### 1.2.3 Métodos de caracterização dos compostos de inclusão

Após o preparo do composto de inclusão é importante caracterizá-lo para conhecer o sistema obtido, uma vez que o produto pode ser simplesmente uma associação, uma mistura do fármaco + ciclodextrina ou composto de inclusão. Para isto, diversas técnicas têm sido utilizadas por pesquisadores, como infravermelho, ressonância magnética nuclear, análise térmica, difração de raios X de pó, microscopia eletrônica de varredura, *estudos in vitro* e *in vivo* (ZANG *et al.*, 2009; LOFTSON *et al.*, 1993; BLAGDEN *et al.*, 2007)

Por exemplo, a técnica de infravermelho nos permite verificar se ocorreu a complexação entre a molécula hospede e a CD, uma vez que as bandas responsáveis pela parte da molécula incluída geralmente são deslocadas ou têm alteradas suas intensidades (ZANG *et al.*, 2007), enquanto a técnica de ressonância magnética nuclear fornece informações sobre interações e modos de ligação nas associações e complexações, além de disposições espaciais de grupos funcionais das moléculas e/ou complexos, pelo fato do processo de inclusão do fármaco alterar o ambiente químico e magnético dos núcleos envolvidos, levando a um deslocamento químico dos sinais de hidrogênio (SCHNEIDER *et al.*, 1998; LOFTSON, *et al.*, 1993).

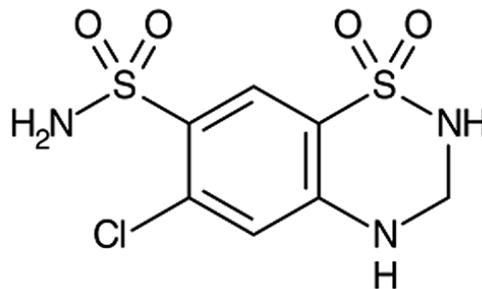
Técnica de difração de raios X de pó e estudos *in vitro* nos possibilitam verificar se a nova entidade química obtida apresenta diferenças nas fases sólidas em relação ao fármaco sozinho, sendo estas responsáveis pelas diferenças na solubilidade do fármaco (BLAGDEN *et al.*, 2007). Mudanças na estabilidade térmica do fármaco também podem ser um indicativo de inclusão ou não fármaco na cavidade de CD, podendo ser verificadas através dos estudos de análise térmica (GIODARNO, NOVAK e MOYANO, 2001).

Neste contexto este trabalho propõe o preparo e caracterização de compostos de inclusão com fármacos de diferentes classes farmacológicas: diurético (Hidroclorotiazida), anti-hiperglicemiante (pioglitazona) e antimicrobiano (claritromicina), fármacos de grande relevância do ponto de vista de saúde pública, usados no Sistema Único de Saúde (SUS), os quais apresentam dentre suas características físico-químicas, a baixa solubilidade em água, sendo que cloridrato de pioglitazona e claritromicina pertencem à BCS II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e hidroclorotiazida a BCS IV (baixa solubilidade e permeabilidade) (KASSIN *et al.*, 2004). Os mesmos estão descritos a seguir.

### 1.3 Diurético, hipoglicemiante e antimicrobiano

#### 1.3.1 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (FIGURA 7) é um diurético padronizado pelo SUS (Farmácia de Minas e Farmácia Popular). Atualmente existem 98 registros de medicamentos na ANVISA que utilizam tanto a hidroclorotiazida isolada ou em associações com outros fármacos (ANVISA, 2011). O Brasil no ano de 2010 importou cerca de 60 toneladas do fármaco, de 60 fabricantes diferentes, totalizando um custo de importação de US\$ 934.483,00 (ABIQUIFI, 2011).



**FIGURA 7** - Fórmula estrutural da Hidroclorotiazida

Hidroclorotiazida é administrada por via oral principalmente no tratamento de edema associado à insuficiência cardíaca e com desordem renal e hepática. Também é indicada em casos de hipertensão, isolada ou em associação com outros agentes antihipertensivos, como por exemplo, os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e beta-bloqueadores.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos graves problemas de saúde pública enfrentada em todo o mundo, apresentando elevada prevalência entre a população adulta. Cerca de 25% da população adulta mundial e 60% da população com idade superior a sessenta anos são acometidos por distúrbios pressóricos caracterizados pela alta pressão. (DIRETRIZES, 2006; JANSEN, 2010). Estima-se que no Brasil cerca de 30 milhões pessoas sofram da doença. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, a hipertensão arterial é responsável por 30% das mortes em todo o mundo. Atualmente é considerado um dos mais importantes fatores de riscos cardiovascular, e a mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com elevação da pressão arterial (PA), (OPAS, 2004).

A hidroclorotiazida pertence à classe dos diuréticos tiazídicos. Atua diretamente sobre os rins, aumentando o fluxo urinário, principalmente a excreção de cloreto de sódio e consequentemente da água. Seu efeito é atribuído ao bloqueio do co-transporte de  $\text{Na}^+$  (sódio) e  $\text{Cl}^-$  (cloreto) eletroneutros, resultando na reabsorção de 90% no sódio filtrado antes do líquido tubular chegar ao local de ação das tiazidas. Pode produzir efeitos bioquímicos adversos incluindo hipocalcemia, hiponatremia e alcalose hipoclorêmica, podendo ainda não ser efetiva em pacientes com insuficiência renal severa, inclusive levando à redução da função renal (GOODMAN e GILMAN, 2006).

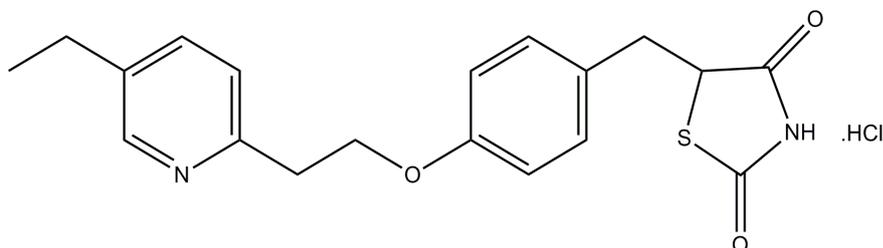
A absorção da hidroclorotiazida ao longo do trato gastrointestinal após dose oral é rápida ( $t_{\text{máx}}$  em torno de 2h), com absorção similar para as formas farmacêuticas suspensão e comprimidos. As cinéticas de distribuição e de eliminação são descritas, geralmente, por uma função de decaimento biexponencial, com uma meia-vida terminal de 6 a 15 horas. O aumento de concentração média na área sob a curva é linear e dose-proporcional na faixa terapêutica. Não ocorrem alterações na cinética de hidroclorotiazida em administrações repetidas e o acúmulo é mínimo quando administrada em dose única diária. A biodisponibilidade absoluta de hidroclorotiazida é de 60 a 80% após administração oral, sendo que mais de 95% da dose absorvida é excretada na urina como composto inalterado e cerca de 4% como composto hidrolisado (2-amino-4-cloro-m-benzenodisulfonamida). Tem sido relatado que a administração concomitante com alimentos pode tanto diminuir como aumentar a disponibilidade sistêmica de hidroclorotiazida, comparando-se com a administração em jejum. A magnitude desse efeito é pequena e tem pouca importância clínica (MARTINDALE, 1996; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Compostos de inclusão entre HTZ e  $\beta$ CD já foram demonstrados por Denadai *et al.* (2006). Os autores prepararam composto de inclusão HTZ/ $\beta$ CD pela técnica de liofilização e demonstraram que a interação entre as moléculas ocorre a uma concentração menor que  $10^{-4}$  mM. Também demonstraram através da técnica de calorimetria de titulação isoterma (ITC) que a formação do composto de inclusão é favorecida quando da presença da  $\beta$ CD em baixas concentrações. Porém não foi realizada uma caracterização completa do composto de inclusão.

### 1.3.2 Cloridrato de Pioglitazona

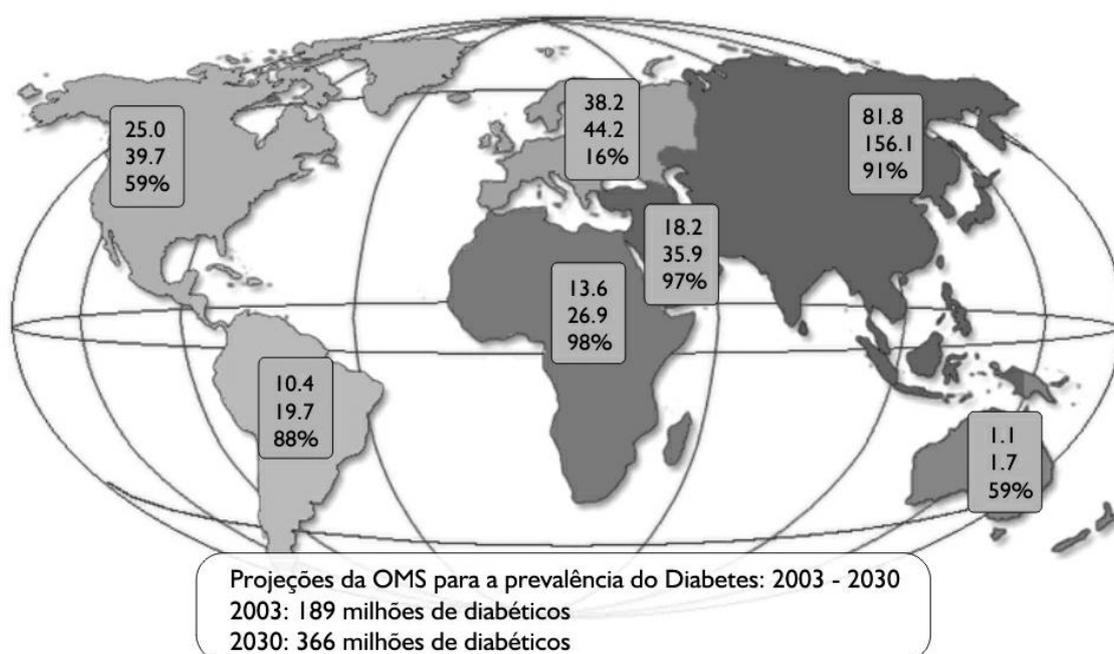
O hipoglicemiante escolhido foi cloridrato de pioglitazona (FIGURA 8). Atualmente existem cinco registros de medicamentos na ANVISA, considerando o uso do cloridrato de pioglitazona puro quanto em associações (ANVISA, 2011). Foram importados, no ano de

2010 pela indústria brasileira, cerca de 50 Kg do fármaco de vários fabricantes, totalizando um custo de importação de US\$ 26.960,00 (ABIQUIFI, 2011).



**FIGURA 8** – Fórmula estrutural do cloridrato de pioglitazona

Cloridrato de pioglitazona é um fármaco sensibilizador da insulina, da família das tiazolidinedonas, indicado para tratamento de diabetes *mellitus* tipo II, doença crônica, herdada ou adquirida, que atinge todas as faixas etárias. É uma doença na qual o pâncreas não produz insulina suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue. Prevalece em 90% dos casos de diabetes (WHO, 2003), e é um problema de saúde pública em praticamente todos os países, o que pode ser observado na FIGURA 9, e implica em elevado impacto sócio econômico.



**FIGURA 9** - Prevalência mundial do diabetes e projeção de aumento até 2030 (Gomes, 2006).

Além dos elevados custos envolvidos no controle da doença e tratamento das complicações agudas e crônicas associadas, leva à incapacidade física permanente por cegueira e/ou amputação de membros e modifica a qualidade e a expectativa de vida do indivíduo.

Cloridrato de pioglitazona tem se mostrado boa opção na abordagem medicamentosa da resistência à insulina em pacientes com a síndrome, correção dos distúrbios metabólicos e segurança posológica (COIMBRA *et al.*, 2006). Este fármaco torna as células mais sensíveis à insulina, o que significa que o organismo utiliza mais eficazmente a insulina que produz e a glicose sanguínea é reduzida. (BRITO, 2006). Este fármaco pode ser utilizado isoladamente (monoterapia) em especial nos pacientes que apresentam excesso de peso que não podem utilizar a metformina (antidiabético). Também é utilizado em conjunto com outros medicamentos antidiabéticos (terapia dupla): em associação com a metformina, em pacientes que não são satisfatoriamente controlados apenas com ela, ou em associação com uma sulfonilureia nos pacientes para os quais a metformina não é adequada e que não são satisfatoriamente controlados com a dose máxima tolerada de uma sulfonilureia isoladamente (COIMBRA *et al.*, 2006; BRITO, 2006).

Os efeitos secundários mais comuns do cloridrato de pioglitazona são distúrbios da visão, infecções do aparelho respiratório superior, aumento de peso e hipoestesia (uma diminuição da sensibilidade aos estímulos (COIMBRA *et al.*, 2006).

O cloridrato de pioglitazona não deve ser utilizado em pessoas que possam ser hipersensíveis (alérgicas) ao fármaco ou a qualquer dos outros ingredientes, nem em pacientes com problemas hepáticos, insuficiência cardíaca ou cetoacidose diabética (níveis elevados de cetonas [ácidos] no sangue) (COIMBRA *et al.*, 2006).

Ali e Upadhyay (2008) estudaram o sistema pioglitazona/ $\beta$ -ciclodextrina e demonstraram a formação do composto de inclusão pela técnica de  $^1\text{H}$ , RMN. Os autores prepararam uma solução de pioglitazona e adicionaram soluções de  $\beta$ -ciclodextrina em concentrações diferentes, com o objetivo de verificar se haveria a inclusão da molécula na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina e em qual proporção molar. Concluíram que o composto de inclusão ocorre na proporção molar de 1:1.

Gajare *et al.* (2009) prepararam o composto de inclusão pioglitazona/HP $\beta$ -ciclodextrina pelo método pasta. O composto de inclusão foi caracterizado pelas técnicas de infravermelho, difração de raios-X de pó, análise térmica e estudos de dissolução. Os autores demonstraram que a formação do composto de inclusão ocorre através de ligações não covalentes entre o fármaco e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, e que o aumento de



Os efeitos adversos mais freqüentes quando do uso da claritromicina são distúrbios gastrointestinais, modificações no paladar, estomatite, glossite e descoloração de dentes. Foram observados, também, elevação da concentração de enzimas hepáticas, icterícia colestática e hepatite. A administração endovenosa pode causar flebite e dor no local da injeção (MARTINDALE, 1996).

Este fármaco é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal após administração oral, apresentando uma biodisponibilidade de aproximadamente 55% da dose. A extensão da absorção não é afetada pela presença de alimentos. O pico da concentração plasmática da claritromicina, e também de seu principal metabólito ativo – 14-hidroxiclaritromicina – é de aproximadamente 0,6 a 0,7  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando um comportamento farmacocinético não linear e dose dependente (MARTINDALE, 1996; GOODMAN e GILMAN 2006; CHU *et al.*, 1992).

A literatura relata estudo de compostos de inclusão para claritromicina/ $\beta$ -ciclodextrina, cujo objetivo foi investigar o efeito do ácido cítrico sobre a complexação de claritromicina com  $\beta$ -ciclodextrina. Os compostos foram preparados pelos métodos de liofilização e coevaporação e caracterizados tanto em soluções como em estado sólido. Os resultados obtidos revelaram importantes modificações nas propriedades físicas do fármaco e que o composto formado entre claritromicina,  $\beta$ -ciclodextrina e ácido cítrico poderia ter um potencial importante no desenvolvimento de uma formulação de uso oral (ZHANG, ZHANG e ZHONG, 2007).



Este trabalho propõe a preparação e caracterização dos compostos de inclusão dos fármacos: hidroclorotiazida, claritromicina e cloridrato de pioglitazona com ciclodextrinas. Embora a literatura relate estudos de compostos de inclusão para fármacos hidroclorotiazida, claritromicina e cloridrato de pioglitazona (DENADAI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; ALI e UPADHYAY, 2008, GAJARE *et al.*, 2009), os objetivos desses pesquisadores foram diferentes dos objetivos proposto para o presente trabalho.

Além da obtenção e caracterização dos compostos de inclusão, os objetivos consistiram na comparação de diferentes métodos de obtenção destes compostos: liofilização e atomização (leito fluidizado e *spray drying*), visando à identificação de sistemas promissores de interesse científico e tecnológico, bem como sua obtenção em maior escala, uma vez que não há descrição da preparação desses compostos por diferentes técnicas, como também a caracterização físico química completa dos compostos, avaliação antimicrobiana (CLA: $\beta$ CD) e ainda avaliação diurética (HTZ: $\beta$ CD) em modelos experimentais *in vivo*.

## 2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos o preparo, a caracterização e avaliação *in vivo* e *in vitro* dos compostos de inclusão obtidos entre ciclodextrinas e os fármacos hidroclorotiazida, cloridrato de pioglitazona e claritromicina, utilizando diferentes técnicas de obtenção.

## 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar e caracterizar através de técnicas físico químicas de análise os compostos de inclusão hidroclorotiazida: $\beta$ -ciclodextrina, obtidos pelas técnicas de *spray drying*, liofilização e leito fluidizado.
- ✓ Avaliar o efeito diurético da hidroclorotiazida pura e do composto de inclusão hidroclorotiazida/ $\beta$ -ciclodextrina em ratos *Wistar*.
- ✓ Preparar e caracterizar através de técnicas físico químicas de análise os compostos de inclusão cloridrato de pioglitazona: $\beta$ -ciclodextrina e cloridrato de pioglitazona:HP $\beta$ -ciclodextrina obtidos pela técnica de *spray drying*.

- 
- ✓ Preparar e caracterizar através de técnicas físico químicas de análise os compostos de inclusão claritromina: $\beta$ -ciclodextrina e claritromina:HP $\beta$ -ciclodextrina obtidos pelas técnicas de *spray drying* e liofilização.
  - ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana da claritromicina pura e dos compostos de inclusão frente à *Staphylococcus aureus*.
  - ✓ Usar técnicas físico-químicas de análise como espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , 2D ROESY, DOSY, análise térmica TG/DTG e DSC, difratometria de raios-X em pó (DRX), análise de tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura (MEV).
  - ✓ Determinar a cinética de liberação dos fármacos e dos respectivos compostos de inclusão *in vitro*.



### 3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a realização deste trabalho foram de grau analítico. Abaixo estão descritos, para as ciclodextrinas e fármacos utilizados no preparo dos compostos de inclusão, a origem e propriedades físico-químicas.

#### $\beta$ -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose

Procedência: CERESTAR®

Lote: 26031210

Fórmula molar:  $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 11H_2O$

Massa molar:  $1134,8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

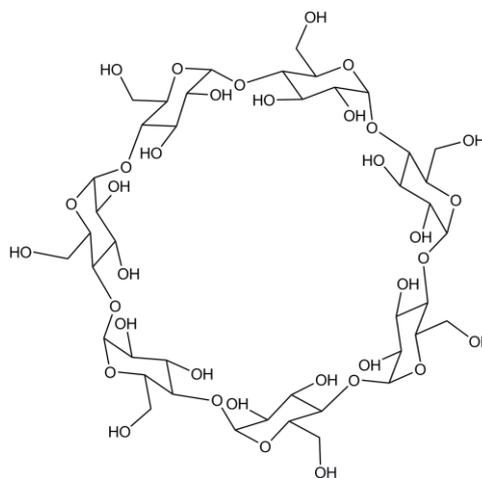
Ponto de decomposição:  $>311,31^\circ\text{C}$

Descrição: sólido branco

Solubilidade: solúvel em água ( $15,9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ )

Pureza: 98 %

Fórmula Estrutural:



#### Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: hidroxipropil-ciclo-hepta-glucoamilose

Procedência: CERESTAR®

Lote: YI- 410-185

Fórmula molar:  $C_{51}H_{88}O_{38} \cdot 11H_2O$

Massa molar:  $1450,02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

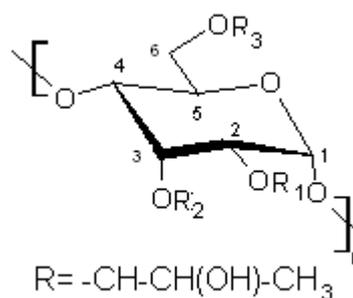
Ponto de fusão:  $>200^\circ\text{C}$

Descrição: sólido branco

Solubilidade: solúvel em água ( $\geq 600 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ )

Pureza: 98 %

Fórmula estrutural:



$R_1=R_2=R_3$

### Hidroclorotiazida

Nomenclatura IUPAC: 6-cloro-7-sulfamila-3,4-dihidro-1,2,4-benzotiazina-1,1-dióxido

Procedência: AUSUN CHEMICAL CO. LTDA.

Lote: 060421

Data da fabricação: 21/04/2006

Fórmula molar:  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Massa molar:  $297,7 \text{ g.mol}^{-1}$

Ponto de fusão:  $268,8^\circ\text{C}$

pKa: 7,9 e 8,2

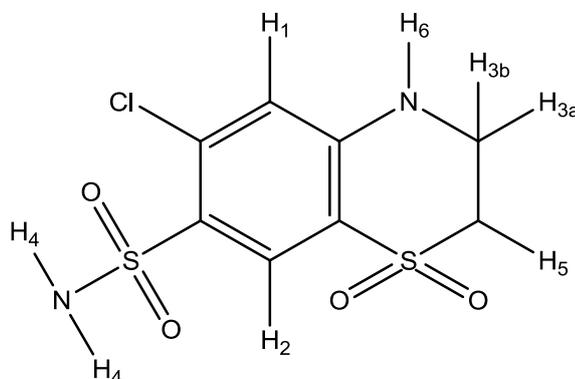
Máximos de absorção no UV-vis: 226 nm, 271 nm, 317 nm

Descrição: sólido branco semicristalino

Solubilidade: solúvel em água ( $2,07 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ )

Pureza: 98 %

Fórmula estrutural:



### Cloridrato de Pioglitazona

Nomenclatura IUPAC: 5-[[4-[2-(5-etil -2 -2-piridina)etoxi]fenil]metil]-tiazolidina-2,4-diona

Procedência: Hetero labs Limited

Lote: PH0040807

Fórmula molar:  $C_{19}H_{20}N_2O_3S.Cl$

Massa molar: 356,44 g

Faixa de fusão:  $192,0^\circ\text{C}$  a  $196,0^\circ\text{C}$

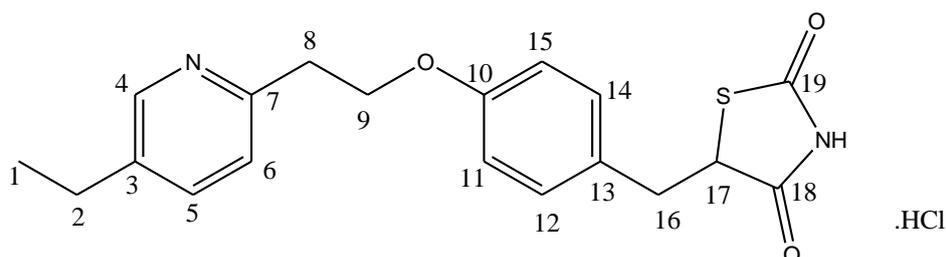
pKa: 4,8

Descrição: sólido branco semicristalino

Solubilidade:  $1,23 \text{ e}^{-5} \text{ mol.mL}^{-1}$

Pureza: 99 %

Fórmula estrutural:



## Claritromicina

Nomenclatura IUPAC:

3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-6-  
 {[{(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-  
 hidróxi-6-metiloxan-2-il]oxi}-14-etil-12,13-  
 dihidróxi-4-[[{(2S,4S,5R,6R)-5-hidróxi-4-  
 metóxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi}-7-metóxi-  
 3,5,7,9,11,13-hexametil-1-  
 oxaciclotetradecano-2,10-diona

Procedência: JINHUA LIXIN PHARMA  
 CHEMICAL CO. LTD

Lote: 06030803

Data da fabricação: 03/02/2006

Fórmula estrutural:

Fórmula molar:  $C_{38}H_{69}NO_{13}$ Massa molar: 747,96 g.mol<sup>-1</sup>

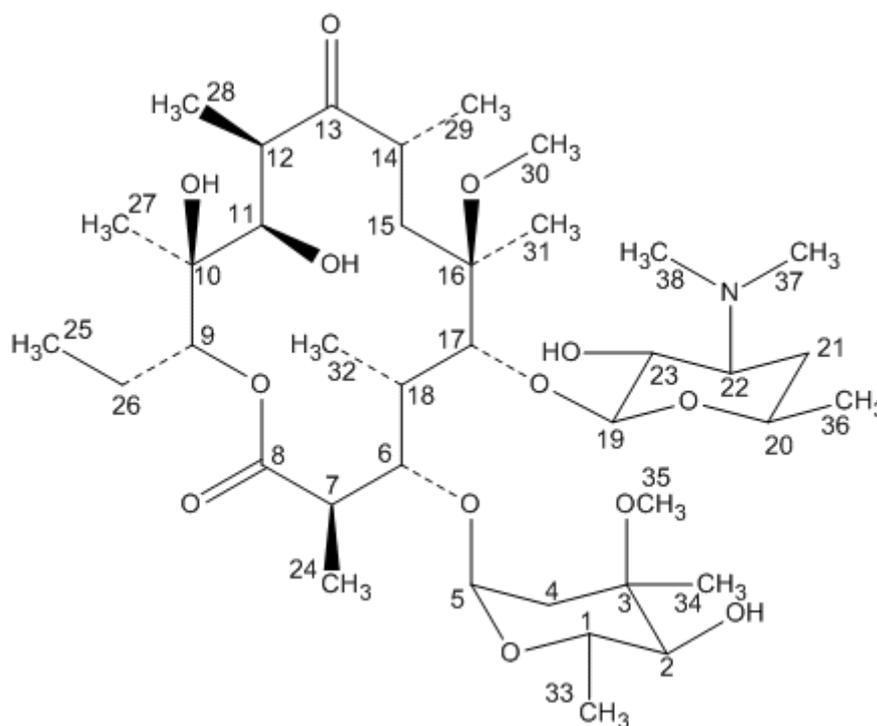
Ponto de fusão: 227°C

pKa: 8,0

Descrição: pó cristalino branco a quase  
 branco

Solubilidade: praticamente insolúvel em  
 água, solúvel em cloreto de metileno e  
 muito pouco solúvel em metanol e  
 acetona. Solúvel em diclorometano.

Pureza: 98 %



## 3.2 Equipamentos e técnicas de caracterização

### 3.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos em espectrofotômetro modelo Spectrum One, Perkin Elmer, Massachusetts, IL, EUA. Os espectros obtidos são resultantes das médias obtidas de 32 varreduras realizadas com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ (RMN) e ROESY

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz). Os solventes utilizados -  $\text{DMSO-}d_6$  ou  $\text{D}_2\text{O}$  - foram de pureza isotópica mínima de 99,5 % de D, da marca Sigma Aldrich. As amostras foram preparadas em tubos de RMN de 8,00 polegadas de comprimento e 5 mm de diâmetro externo. Os experimentos unidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizados em sonda de 5 mm, dual  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , de detecção direta. Os experimentos bidimensionais de detecção direta ROESY foram realizados em sonda de 5 mm multinuclear de detecção inversa. O tempo de mistura foi equivalente a 500 msec. A análise foi conduzida a 27°C.

### 3.2.3 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas utilizando-se as termobalanças Mettler TGA-SDTA 851 Star<sup>®</sup> system (Mettler Toledo, Switzerland), sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ , com vazão aproximada de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras (4-6 mg) foram pesadas em cadinho aberto de alumina. A razão de aquecimento na termodecomposição foi de 2°C. $\text{min}^{-1}$ . As amostras foram aquecidas de 25 a 450°C. O aparelho foi calibrado com padrão de índio e alumínio.

### 3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando-se o sistema Mettler 822 Star<sup>®</sup> system (Mettler Toledo, Switzerland) sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ , vazão de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras (2-3 mg) foram pesadas em cadinho de alumina e a razão de aquecimento foi de

2°C.min<sup>-1</sup>. As amostras foram aquecidas de 25 a 450°C. O aparelho foi calibrado com padrão de índio e zinco.

### 3.2.5 Difractometria de Raios-X de Pó (DRX)

Difratogramas de raios-X de pó foram registrados no aparelho Rigaku Geiger-flex 037, utilizando-se tubo de cobre e radiação CuK $\alpha$  = 1,54051, em ângulos de 2 $\theta$  variando de 4 a 60 graus e velocidade de varredura de 4 $\theta$ .min<sup>-1</sup>.

### 3.2.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta (UV-vis)

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis foram registrados em espectrofotômetro Unicam UV3. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1cm.

### 3.2.7 Liofilização

As liofilizações foram realizadas no equipamento Thermo, modelo Savant Modulo D Freeze Dryer-115 com capacidade para 69 L.

### 3.2.8 *Spray Drying*

A secagem foi realizada em equipamento BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 nas seguintes condições operacionais: temperatura de entrada: 90°C; temperatura de saída: 40°C; injeção de 17 mL.min<sup>-1</sup>; aspirador: 90 %; fluxo de ar de 30 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> e pressão de ar de atomização de 1,0 Bar.

### 3.2.9 Leito Fluidizado

A secagem foi realizada em equipamento da marca Glatt, utilizando-se as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada: 150°C; temperatura de saída: 80°C, velocidade de injeção: 30 mL.min<sup>-1</sup>.

### 3.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de microscopia eletrônica foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JFM 840A<sup>®</sup>. As amostras foram fixadas em fita condutora e recobertas por uma fina camada de ouro (1000-300 Å) por dois ciclos de 240 segundos.

### 3.2.11 Tamanho de Partículas por Espalhamento de luz

A dimensão das partículas (matérias-primas) foi avaliada por equipamento de espalhamento de luz Mastersizer HYDRO 2000M/MU, modelo AWM 2000. O composto de inclusão foi disperso em óleo vegetal e a suspensão foi sonicada por 5 min. A análise foi realizada em triplicata.

### 3.2.12 Dissolução

Os estudos de cedência dos fármacos foram realizados utilizando dissolutor automático da Varian, modelo 7025VK, e a metodologia analítica empregada foi de acordo com a farmacopéia americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

Os fármacos foram quantificados por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), utilizando Espectrofotômetro Unicam UV3 – e HPLC DAD Merck LaChrom Elite e HPLC UV/VIS Merck LaChrom Elite.

## 3.3 Métodos de preparo dos compostos de inclusão

Os compostos de inclusão descritos neste trabalho foram preparados de acordo com métodos previamente descritos na literatura para a inclusão de fármacos em ciclodextrinas. Foram realizadas modificações, de acordo com os métodos já estabelecidos no Laboratório de Encapsulamento Molar e Biomateriais do Departamento de Química da UFMG (HARADA, 1988; DENADAI *et al.*, 2006).

### Método de Liofilização

A ciclodextrina e o fármaco foram solubilizados separadamente em água destilada, sob agitação magnética, com ligeiro aquecimento (40-50°C). A solução de ciclodextrina foi vertida lentamente sobre a solução do fármaco e mantida sob agitação por 4 horas. A

solução foi congelada em nitrogênio líquido e submetida à liofilização por aproximadamente 48 horas, obtendo assim o composto de inclusão.

Método de Atomização: *spray drying* e leito fluidizado

Para a obtenção dos compostos de inclusão pela técnica de *spray drying*, seguiu-se a metodologia: Dissolveu-se a ciclodextrina em água destilada, sob agitação, ligeiro aquecimento (40-50°C). Dissolveu-se o fármaco em etanol, sob agitação e verteu-se a solução de ciclodextrina sobre a solução da molécula hóspede lentamente e a solução foi mantida sob agitação por 4 horas. Levou-se a solução resultante ao equipamento e procedeu-se à secagem por *spray-drying*, utilizando as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada: 90°C; temperatura de saída: 40°C; injeção de 17mL.min<sup>-1</sup>; aspirador: 90 %; fluxo de ar de 30 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> e pressão de ar de atomização de 1,0 Bar.

Para a obtenção dos compostos de inclusão pela técnica de leito fluidizado, seguiu-se a seguinte metodologia: solubilizou-se a ciclodextrina e o fármaco separadamente em água destilada, sob agitação, com ligeiro aquecimento (40-50°C). Verteu-se lentamente a solução de ciclodextrina sobre a solução do fármaco e se manteve sob agitação por 4 horas. Levou-se a solução resultante ao equipamento para proceder-se a técnica de secagem, sob as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada: 150°C; temperatura de saída: 80°C.

Mistura física

Para controle da complexação dos fármacos com a  $\beta$ -ciclodextrina e HP- $\beta$ -ciclodextrina pelas técnicas citadas preparou-se também uma mistura física entre a ciclodextrina e cada um dos fármacos, separadamente. Em todas as situações utilizou-se a proporção molar de 1:1 entre o fármaco e a ciclodextrina. Basicamente, antes de realizada a caracterização físico-química os pós foram misturados dentro de *ependorf* de 2,0 mL e agitados vigorosamente no vortex por 1 minuto.

### 3.3.1 Composto de inclusão entre hidroclorotiazida e $\beta$ -ciclodextrina (HTZ: $\beta$ CD).

Os compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD foram preparados pelos métodos de liofilização, *spray drying* e leito fluidizado na proporção molar de 1:1. Foram pesados 250 mg de HTZ e 955 mg de  $\beta$ CD obtendo soluções a 0,84 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Composto de inclusão entre cloridrato de pioglitazona e $\beta$ -ciclodextrina (PIO: $\beta$ CD)

O composto de inclusão PIO: $\beta$ CD foi preparado apenas pelo método de *spray drying* na proporção molar de 1:1. Foram pesados 250 mg de PIO e 796 mg de  $\beta$ CD obtendo soluções 0,7 mmol.L<sup>-1</sup>.

Não foi preparado compostos de inclusão por liofilização e leiteo fluidizado devido a baixa solubilidade do fármaco.

### 3.3.3 Composto de inclusão entre cloridrato de pioglitazona e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (PIO:HP $\beta$ CD)

O composto de inclusão PIO:HP $\beta$ CD também foi preparado pelo método de *spray drying* na proporção molar de 1:1. Foram pesados 250 mg de PIO e 1.020 mg de HP $\beta$ CD obtendo soluções 0,7 mmol.L<sup>-1</sup>.

Não preparou compostos de inclusão por liofilização e leiteo fluidizado devido a baixa solubilidade do fármaco.

### 3.3.4 Composto de inclusão entre claritromicina e $\beta$ -ciclodextrina (CLA: $\beta$ CD)

Os compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD, foram preparados pelos métodos de liofilização e *spray drying* em proporções molares de 1:1 e 1:4. Foram pesados 250 mg de CLA e 379 mg de HP $\beta$ CD para a proporção molar de 1:1 e para a proporção molar de 1:4 foram pesados 250 mg de CLA e 1520 mg de  $\beta$ CD, obtendo soluções a 0,33 mmol.L<sup>-1</sup>

Não foram preparados compostos de inclusão por leiteo fluidizado por problemas técnicos no equipamento.

### 3.3.5 Composto de inclusão entre claritromicina e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (CLA:HP $\beta$ CD)

Os compostos de inclusão CLA:HP $\beta$ CD, foram preparados pelos métodos de liofilização e *spray drying* em proporções molares 1:1 e 1:4. Foram pesados 250 mg de CLA e 485 mg de HP $\beta$ CD para a proporção molar de 1:1 e para a proporção molar de 1:4 foram pesados 250 mg de CLA e 1940 mg de HP $\beta$ CD, obtendo soluções a 0,33 mmol.L<sup>-1</sup>

Foi preparado composto de inclusão na proporção molar de 1:4 devido à baixa solubilidade do fármaco e também ao tamanho da molécula.

### 3.4 Preparo das cápsulas contendo fármacos e cápsulas contendo compostos de inclusão para análises de perfil de dissolução

#### 3.4.1 Cápsulas contendo PIO e cápsulas contendo compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD

Com o objetivo de realizar o perfil de dissolução do fármaco puro e de seus respectivos compostos de inclusão prepararam-se cápsulas. O fármaco puro e seus respectivos compostos de inclusão foram encapsulados utilizando encapsulador manual. A massa encapsulada foi previamente calculada, considerando a dose terapêutica do fármaco de 15 mg no caso de cloridrato de pioglitazona e de 62,7 mg, equivalentes a 15 mg de cloridrato de pioglitazona, no caso do composto de inclusão.

#### 3.4.2 Cápsulas contendo CLA e cápsulas contendo compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD nas proporções molares de 1:1 e 1:4

Com o objetivo de realizar os perfis de dissolução da claritromicina e de seus respectivos compostos de inclusão, foram preparadas cápsulas contendo 150 mg de claritromicina e 378 mg de composto de inclusão CLA: $\beta$ CD (proporção molar 1:1) contendo 150 mg do fármaco. Também preparou-se cápsulas com 354 mg de composto de inclusão CLA: $\beta$ CD (proporção molar 1:4), contendo 50 mg do fármaco. O fármaco puro e seus respectivos compostos de inclusão foram encapsulados utilizando encapsulador manual.

#### 3.4.3 Preparação de formulação farmacêutica sólida de uso oral contendo HTZ: $\beta$ CD.

A fim de confirmar a melhora da solubilidade do fármaco incluído em ciclodextrina, desenvolveu-se uma formulação em cápsula, considerando a dose terapêutica do fármaco de 25 mg. Para isso foi utilizado um encapsulador manual. A proporção final da formulação foi a seguinte: composto de inclusão 60%, celulose microcristalina 36%, croscarmelose sódica 2%, dióxido de silício coloidal 1% e estearato de magnésio 1%.

### 3.5 Estudos de dissolução

#### 3.5.1 Hidroclorotiazida pura e composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD

Os perfis de dissolução para os compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtidos pelos três métodos *spray drying*, liofilização e leite fluidizado foram realizados usando o método de dissolução intrínseca.

O estudo para determinação da dissolução intrínseca foi baseado no método geral <1087> da USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink* empregando 900 mL de solução de ácido clorídrico (0,1 mol.L<sup>-1</sup>), pH= 1,2, mantido a 37 ± 0,5°C a 100 RPM. O teste foi realizado em quaduplicata.

Para execução dos testes foram preparados discos de 8 mm usando prensa hidráulica Perkin Elmer (Massachusetts, IL, EUA). Estes discos foram obtidos por aplicação de força igual a três toneladas por um minuto sobre 200 mg de amostra. Os produtos analisados foram os complexos HTZ: $\beta$ CD (obtidos por *spray drying*, liofilização e leite fluidizado) e HTZ. O sistema foi montado em dissolutor modelo ERWEKA DT800 (Distek Inc., NJ, EUA.) acoplado a bomba peristáltica modelo HP 89092A (Agilent Technologies Itália SpA., Roma, Itália).

Para os complexos obtidos foram retiradas amostras a cada 5 minutos até completar 50 minutos de teste. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro 0,45  $\mu$ m. HTZ foi quantificada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), utilizando Espectrofotômetro Unicam UV3 a 270 nm.

Os dados de concentração de HTZ em função do tempo deram origem a um gráfico que permitiu a construção de curvas e obtenção de regressões lineares de primeira ordem. Apenas a porção linear é interessante para o teste, permitindo calcular a partir da inclinação da reta, a velocidade de dissolução intrínseca em mg.cm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>.

#### 3.5.2 Cápsulas de HTZ e compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD - formulação final.

O estudo para determinação da dissolução para as cápsulas de hidroclorotiazida foi realizado segundo metodologia descrita na USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink*

empregando 900 mL de solução de ácido clorídrico ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH= 1,2, mantido a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 100 RPM. O teste foi realizado em quadruplicata.

Para realização dos testes foram preparadas cápsulas contendo o equivalente a 25mg de HTZ. As cápsulas analisadas continham o produto obtido a partir dos complexos HTZ : $\beta$ CD (obtidos por *spray drying*, liofilização e leite fluidizado) e HTZ. O sistema foi montado em dissolutor modelo ERWEKA DT800 (Distek Inc., NJ, EUA) acoplado a bomba peristáltica modelo HP 89092A (Agilent Technologies Itália SpA., Roma, Itália).

Foram retiradas amostras a cada 5 minutos até completar 50 minutos de teste. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro  $0,45 \mu\text{m}$ . HTZ foi quantificada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), utilizando Espectrofotômetro Unicam UV a 270 nm. Os resultados foram expressos em percentual de cedência do fármaco.

### 3.5.3 Cloridrato de pioglitazona e composto de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD

Para a determinação da dissolução do fármaco puro e incluído em ciclodextrinas foram preparadas cápsulas contendo PIO, PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD. O teste foi realizado segundo metodologia descrita na USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink* empregando 900 mL de solução de tampão de KCl, pH 2,0 mantido a  $37^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 75 RPM. O teste foi realizado em quadruplicata.

A dissolução foi realizada em dissolutor modelo ERWEKA DT800 (Distek Inc., NJ, EUA.) acoplado a bomba peristáltica modelo HP 89092A (Agilent Technologies Itália SpA., Roma, Itália).

A amostragem se deu a cada 5 minutos até completar 50 minutos de teste. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro  $0,45 \mu\text{m}$ . PIO foi quantificada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) a 225 nm, em HPLC UV/VIS Merck LaChrom Elite. Os resultados foram expressos em percentual de cedência do fármaco.

### 3.5.4 Claritromicina e composto de inclusão CLA: $\beta$ CD e CLA:HP $\beta$ CD

#### Dissolução 1. Tampão acetato de sódio pH 5,0

Para a determinação da dissolução do fármaco e também do fármaco a partir dos compostos de inclusão foram preparadas cápsulas contendo CLA, e compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD obtidos pelas técnicas de liofilização e spray drying e o teste foi realizado segundo metodologia descrita na USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink* empregando 150 mL de solução de solução tampão acetato de sódio, pH 5,0 mantido a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 50 RPM. O teste foi realizado em quaduplicata.

A dissolução foi realizada em dissolutor modelo ERWEKA DT800 (Distek Inc., NJ, EUA.) acoplado a bomba peristáltica modelo HP 89092A (Agilent Technologies Itália SpA., Roma, Itália).

A amostragem se deu a cada 5 minutos até completar 75 minutos de teste. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro 0,45  $\mu\text{m}$ . CLA foi quantificada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), em HPLC UV/VIS Agilent a 225 nm. As condições das análises foram as seguintes: coluna: C18 HYPersil BDS 25 cm X4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ . Fluxo da fase móvel 1mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção da amostra 25 $\mu\text{L}$ , temperatura do forno 50 $^\circ\text{C}$ , tempo de corrida 10 min. Os resultados foram expressos em percentual de cedência do fármaco.

#### Dissolução 2. Em água

Para a determinação da dissolução do fármaco livre e incluído em ciclodextrina foram preparadas cápsulas contendo CLA e compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD obtidos pelas técnicas de liofilização e spray drying. O teste foi realizado segundo metodologia descrita na USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink* empregando 150 mL de água Milli-Q, mantida a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 50 RPM. O teste foi realizado em quaduplicata.

A amostragem se deu a cada 5 minutos até completar 75 minutos de teste. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro 0,45  $\mu\text{m}$ . CLA foi quantificada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), em HPLC UV/VIS Agilent a 225 nm. Os resultados foram expressos em percentual de cedência do fármaco.

### 3.6 Teste antimicrobiano

#### 3.6.1 Determinação da atividade antimicrobiana da CLA e dos compostos de inclusão CLA: $\beta$ CD obtidos por spray drying e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4.

Para a determinação da atividade antimicrobiana da CLA e de seus respectivos compostos de inclusão foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana segundo a farmacopéia americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008) e Koneman (2001). A cepa utilizada para a determinação da atividade antimicrobiana foi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

O procedimento adotado para o ensaio microbiológico está descrito a seguir.

##### 3.6.1.1 Preparação do inóculo do microorganismo

a) Usando a escala MacFarland. O inóculo foi preparado utilizando a escala MacFarland a uma concentração correspondente à turvação de  $6 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para isto foram pipetados 9,8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1mol.L<sup>-1</sup> solução reagente - SR - e em seguida 0,2 mL de BaCl<sub>2</sub> 1mol.L<sup>-1</sup>. A turvação obtida é correspondente a  $6 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 utilizada na análise foi previamente replicada, colocada em tubo de ensaio contendo meio de cultura TSA (Agar Soja Caseína) inclinado, e incubada em estufa na faixa de 32°C – 37°C.

Pipetaram-se 10,0 mL de salina estéril em um tubo 16 x 160 mm, idêntico ao tubo em que a escala MacFarland foi preparada. Acrescentou-se a cultura de microorganismo a ser analisada, até observar turvação correspondente à da escala MacFarland de  $6,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram homogeneizados no vórtex e comparados contra uma superfície preta imediatamente após a homogeneização.

Pipetaram-se 9,9 mL de salina estéril em um tubo de ensaio 16 x 160 mm e procedeu-se a diluição decimal da suspensão de microorganismos utilizando 0,1 mL da suspensão anteriormente preparada, obtendo-se a concentração de  $6,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. As demais diluições decimais foram preparadas até atingir-se uma concentração de  $6,0 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

b) Usando o espectrofotômetro: Preparou-se a suspensão do microorganismo em um tubo, adaptável ao espectrofotômetro, contendo 5,0 mL de salina estéril. Foi realizada leitura da

transmitância a 580 nm, utilizando uma faixa de concentração de  $24 \pm 2 \%$ , correspondente a  $6,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 3.6.1.2 Diluição das amostras

As soluções de claritromicina e de seus respectivos compostos de inclusão foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, calibrados. O pH das soluções foi corrigido utilizando-se NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> SR ou HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> SR, para que o pH ficasse entre 6,0-7,0. Foram usados papéis indicadores de pH para visualização.

Adicionaram-se 9,0 mL de meio de cultura TSB (Caldo Caseína Soja), em tubos de ensaio 16 x 160 mm que foram utilizados nas concentrações do produto estabelecidas no escopo da análise de 128µg.mL<sup>-1</sup> até 0,25 µg.mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram homogeneizados.

#### 3.6.1.3 Preparação e inóculo das placas de Petri

Adicionou-se 1,0 mL de cada diluição do produto previamente preparada, conforme item 3.6.1.2 às placas de Petri estéreis, identificadas, em duplicata. Acrescentou-se às placas 0,1 mL da suspensão do microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na concentração de  $6,0 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>; em seguida adicionou-se às placas 20,0 mL do ágar TSA (Ágar Caseína Soja), fundido e resfriado em banho-maria regulado para 45–46°C. Homogeneizou-se cuidadosamente com movimentos em forma de oito (8) aproximadamente 10 vezes, evitando que o ágar fosse projetado contra as paredes ou na tampa da placa. Após a solidificação do agar, as placas foram incubadas invertidas, em estufa na faixa de 32–37°C por 24 horas.

#### 3.6.1.4 Preparação dos tubos com o microorganismo

Os tubos contendo as diversas concentrações dos produtos utilizados nas análises foram contaminados com 0,1 mL da suspensão do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; em seguida homogeneizados e incubados em estufa regulada e qualificada para 32–37°C por 24 horas.

### 3.6.1.5 Preparação dos inóculos controle

As placas controle foram preparadas em duplicata contendo 0,1 mL da suspensão do microorganismo e 20,0mL do meio TSA fundido e resfriado, enquanto os tubos controles foram preparados em duplicata contendo 0,1 mL da suspensão do microorganismo e meio TSB. Os mesmos foram incubados em estufa na faixa de 32– 37°C por 24 horas.

### 3.6.1.6 Resultados

A leitura dos tubos foi feita após 24 horas de incubação e também observou-se a presença ou ausência de turvação. Procedeu-se ao plaqueamento por estrias, em meio TSA, do conteúdo dos tubos que apresentaram turvação e dos tubos onde a turvação foi ausente. Em seguida as placas foram incubadas em estufa na faixa de 32–37°C por 24 horas. Após 24 horas de incubação fez-se a leitura das placas.

### 3.6.1.7 Avaliação do Resultado

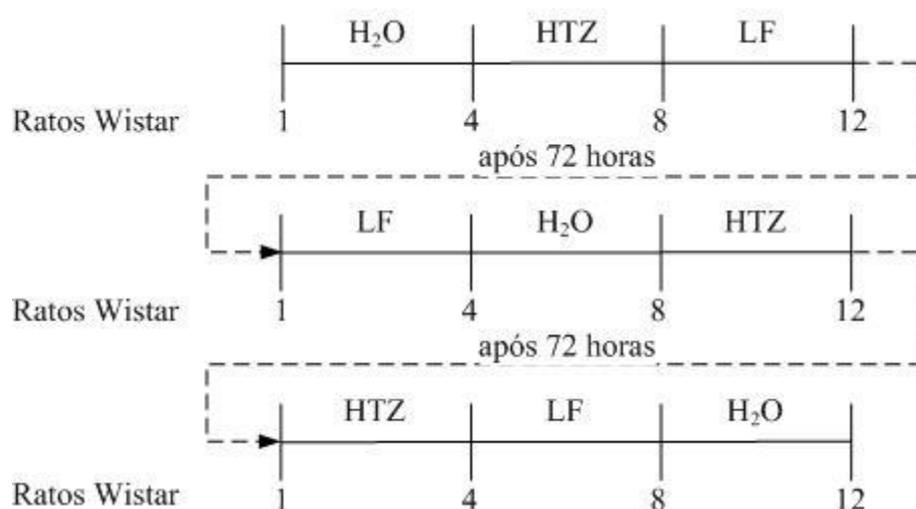
- Se nas placas com determinada concentração dos compostos utilizados, segundo escopo estabelecido, não foram evidenciadas colônias dos microorganismos, expressar o resultado como “ausência de microorganismo na concentração utilizada do produto”. A presença de crescimento do microorganismo utilizado, frente à amostra e respectivo controle, indicam ausência de substâncias inibidoras;
- Crescimento microbiano em número menor, nas placas contendo determinada concentração dos compostos de inclusão, e o respectivo controle indicam atividade antimicrobiana;
- Ausência de crescimento microbiano, nas placas contendo determinada concentração dos produtos, e o respectivo tubo (ausência de turvação) indicam atividade antimicrobiana, efeito bactericida;
- Ausência de crescimento microbiano no tubo (ausência de turvação) em determinada concentração do produto e presença de crescimento microbiano na placa de Petri, indicam efeito bacteriostático nesta concentração do produto.

### 3.7 Determinação da atividade diurética do composto de inclusão: HTZ: $\beta$ CD

A determinação da ação diurética do composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD/ foi realizada em ratos, pesando entre 300–350 gramas, provenientes do Cebio (Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais). O teste foi realizado no laboratório de hipertensão coordenado pelo Professor Robson Santos do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-UFMG.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos em temperatura ambiente em um ciclo de 12/12horas (dia/noite). Os ratos foram randomizados em três grupos experimentais: controle (n = 4), HTZ (n = 4) e LF (n = 4). Após 48 horas de adaptação em gaiolas metabólicas, os ratos receberam por gavagem: 1 mL de água destilada, HTZ 10mg.Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, disperso em 1 mL de água destilada e HTZ: $\beta$ CD 38 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal, disperso em 1 mL de água destilada equivalente a 10mg.Kg<sup>-1</sup> de HTZ.

Os três grupos foram alocados em três tratamentos diferentes, conforme demonstrado na FIGURA 11 a seguir. O volume urinário foi registrado após 2, 4, 8, 24, 32 e 48 horas após a administração por gavagem da água, HTZ e HTZ: $\beta$ CD . Posteriormente foram determinadas a osmolaridade e concentração de sódio na urina. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  DPR. Os dados foram tratados usando o programa Prisma v.5 e foram considerados como significativos quando  $p < 0,05$ .



**FIGURA 11** - Representação esquemática da administração da HTZ e composto de inclusão obtido pela técnica de leite fluidizado (LF) nos ratos Wistar.

### 3.7.1 Dosagem de sódio na urina.

As determinações de sódio das amostras de urina após 2, 4, 8, 24, 32 e 48 horas de coleta foram realizadas por fotometria de chama (Fotômetro FC-180, CELM). Para a determinação do sódio urinário, a urina era previamente diluída 1:200 e eram então pipetados 15 $\mu$ l das diluições e os volumes foram completados para 3 mL de água deionizada.

As concentrações de sódio sérico foram obtidas pela leitura direta do fotômetro. Os valores lidos a partir das amostras de urina eram multiplicados pelo fator de diluição. Todas as amostras foram processadas em duplicata e rediluídas, no caso de serem detectadas diferenças consideráveis entre essas duplicatas. Os dados obtidos foram expressos como concentração mEq.L<sup>-1</sup>.

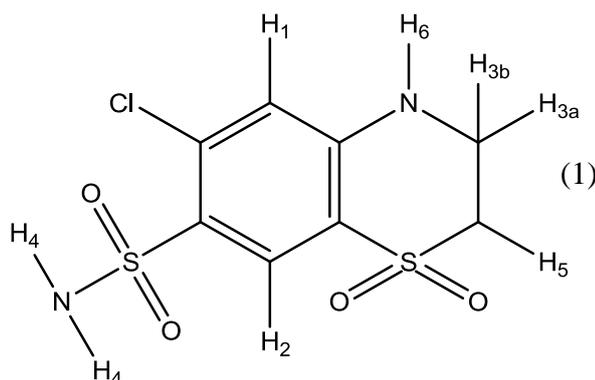
### 3.7.2 Osmolalidade na urina

Utilizando-se o método de osmometria de congelamento, com o auxílio do osmômetro (MicroOsmette, Natick, EUA), foram determinadas as osmolalidades sérica e urinária. O osmômetro foi calibrado usando três soluções padrão contendo diferentes osmolalidades (100, 290, 500 mOsm.Kg<sup>-1</sup> de água). A faixa de leitura usada foi de 0 a 3000 mOsm.Kg<sup>-1</sup> de água. O valor obtido nesta leitura foi multiplicado pelo fator de diluição para determinação da osmolalidade urinária das amostras. Foram realizadas duas leituras para cada amostra de urina. Quando, entre essas leituras, foram observadas diferenças maiores que 10%, a calibração do osmômetro era repetida, realizando-se uma nova leitura.



#### 4.1 Hidroclorotiazida, $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de inclusão

A hidroclorotiazida (1) foi caracterizada por meio de métodos convencionais de análise, como espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), análise térmica (TG/DTG/DTA e DSC), difração de raios-X de pó e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizando técnicas modernas uni- e bidimensionais.



Para o fármaco hidroclorotiazida foram preparadas formulações com  $\beta$ -ciclodextrina pelas técnicas de liofilização, *spray drying* e leito fluidizado na proporção molar 1:1.

##### 4.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.

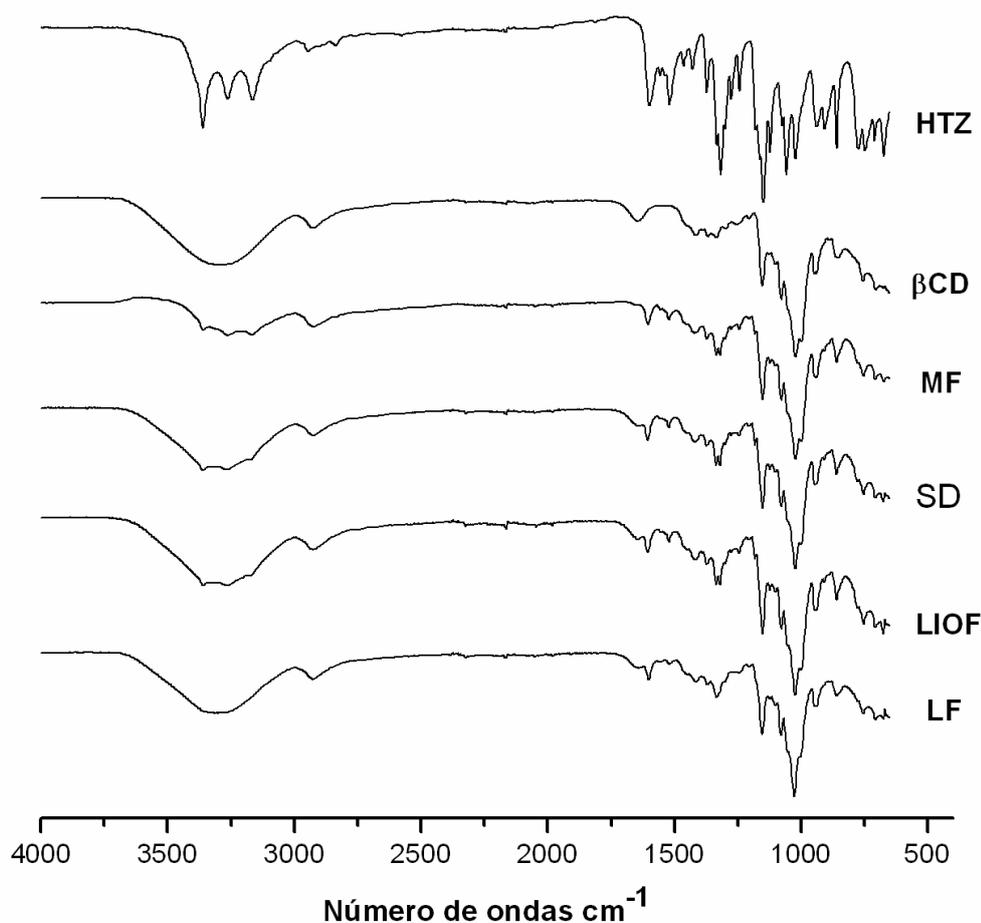
Os principais grupos funcionais e as correspondentes bandas de absorção observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho para HTZ,  $\beta$ CD, MF e compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtidos por diferentes técnicas são mostrados na FIGURA 12.

Através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho verificam-se as bandas em  $3301\text{ cm}^{-1}$ ,  $1604\text{ cm}^{-1}$ ,  $1265\text{ cm}^{-1}$  e  $721\text{ cm}^{-1}$ , associadas às ligações de estiramento NH, C=C de aromático, SO<sub>2</sub> e NH, NH<sub>2</sub> respectivamente, correspondendo a bandas de absorção típicas para HTZ. Esses dados confirmam as absorções citadas em literatura para o fármaco (ACECVES-HERNANDEZ *et al.*, 2006).

O espectro de IV para  $\beta$ -ciclodextrina mostra uma banda larga em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , atribuída aos modos de estiramento simétrico e assimétrico do grupo OH. Em  $2928\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda referente ao estiramento da ligação C-H ( $\nu_{\text{C-H}}$ ). Em torno da região de  $1640\text{ cm}^{-1}$

observam-se bandas correspondentes à deformação do grupo –OH ( $\delta_{OH}$ ) de moléculas de água complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina. As bandas de absorção C–OH na região de 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$  correspondem aos modos de deformação O–H no plano da  $\beta$ CD. São ainda observadas bandas de estiramento assimétrico de C–O–C na região de 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente, as bandas apresentadas na região de 800-400  $\text{cm}^{-1}$  são correspondentes às vibrações do anel da ciclodextrina. Essas atribuições estão de acordo com aquelas descritas pela literatura (RUSSEL *et al.*, 1989; GIORDARNO *et al.*, 2001).

Comparando o espectro do fármaco livre, mistura física e seus compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD percebe-se uma perda de resolução nas bandas típicas para HTZ, observadas em 3300  $\text{cm}^{-1}$ , 1264  $\text{cm}^{-1}$  e 721  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao NH, SO<sub>2</sub> e ligações NH e NH<sub>2</sub>, respectivamente (ACECVES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Desaparecimento da banda de deformação OH ( $\delta$  OH, 1640  $\text{cm}^{-1}$ ) de moléculas de água na cavidade  $\beta$ -CD pode ser observado na MF e nos espectros dos compostos de inclusão. Este fato pode sugerir a formação de compostos de inclusão, pela perda de água da cavidade CD e posterior inclusão da HTZ (SOUZA *et al.*, 2008). Analisando os espectros na região de 3500 a 3400  $\text{cm}^{-1}$  pode-se observar que o composto LF difere do espectro da HTZ,  $\beta$ CD, MF e dos compostos SD e LIOF, sugerindo uma maior interação dos hidrogênios do fármaco com os hidrogênios da  $\beta$ CD quando comparado a SD e LIOF. Os espectros de IV para os compostos de inclusão sugerem que as três técnicas utilizadas para obter HTZ: $\beta$ CD são adequadas para obter os compostos de inclusão, porém não foi a melhor técnica utilizada, para confirmar a inclusão do fármaco em ciclodextrinas.



**FIGURA 12** - Espectros de absorção na região do infravermelho para hidroclorotiazida (HTZ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura físicos (MF), compostos de inclusão obtidos pelas técnicas *spray drying* (SD), liofilização (LIOF), leite fluidizado (LF)

#### 4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear- RMN

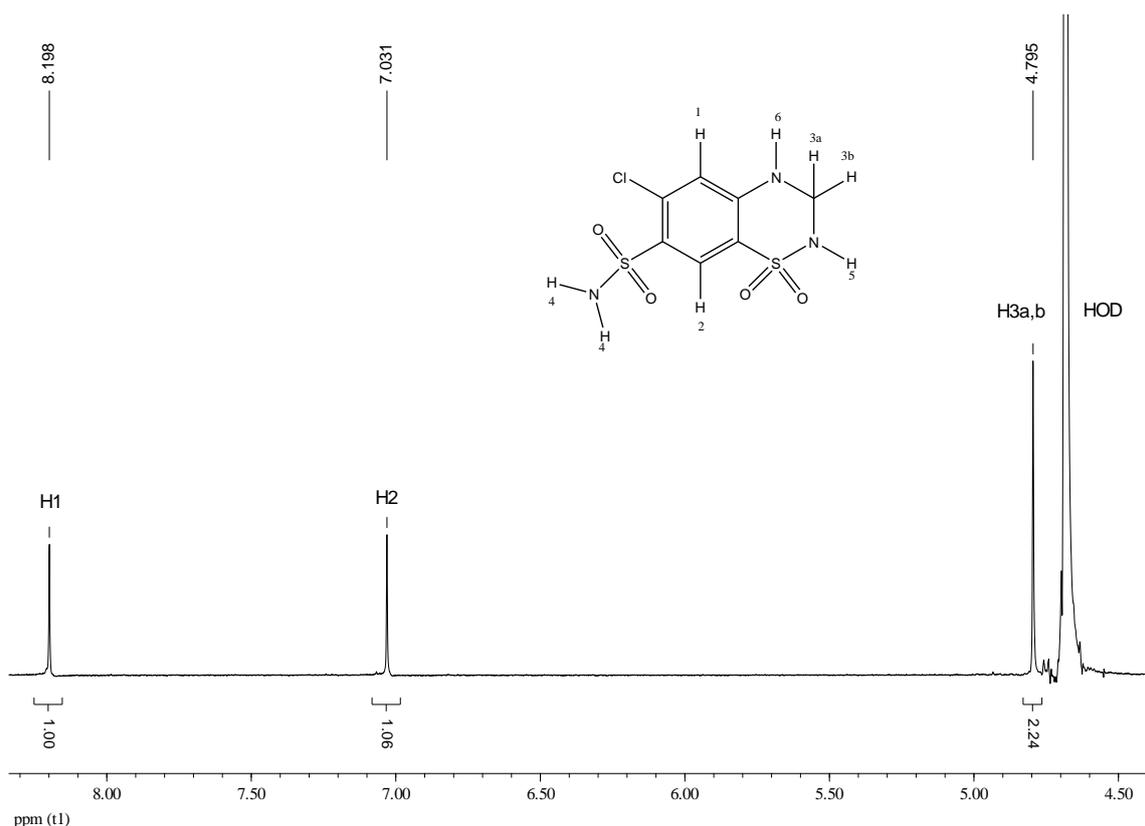
Atualmente a ressonância magnética é um dos mais importantes métodos não só para elucidação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos como também para estudo dos compostos de inclusão com ciclodextrinas. Esta técnica permite a caracterização tanto em solução quanto em estado sólido (SCHEIDER *et al.*, 1998; LOFTSSON *et al.*, 1993).

O processo de inclusão de um fármaco na cavidade da ciclodextrina altera o ambiente químico e magnético dos núcleos envolvidos levando a um deslocamento químico destes sinais. Estas variações algumas vezes são limitadas a décimos de ppm, uma vez que durante a formação de um composto de inclusão são observadas apenas interações dipolares entre hóspede e hospedeiro sem a formação de qualquer ligação covalente (SCHNEIDER *et al.*, 1998).

A fim de confirmar as interações no sistema HTZ: $\beta$ CD anteriormente observadas através da técnica FTIR, a ressonância magnética nuclear também foi utilizada.

Compostos obtidos entre HTZ e  $\beta$ CD por liofilização já foram descritos na literatura anteriormente e a espectroscopia de RMN foi empregada para confirmar a inclusão da HTZ na cavidade da  $\beta$ CD (DENADAI *et al.*, 2005). A FIGURA 13 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da HTZ em  $\text{D}_2\text{O}$ . Observam-se apenas os sinais de ressonância para os hidrogênios H1, H2 e H3a e H3b, enquanto os hidrogênios dos grupos NH e  $\text{NH}_2$  da HTZ não aparecem no espectro, uma vez que ocorre a troca espontânea dos hidrogênios com os átomos de deutério do solvente (SILVERSTEIN e BASSLER, 2007; DENADAI *et al.*, 2005).

De acordo com a estrutura da HTZ o sinal do hidrogênio H1 é o mais blindado devido à proximidade dos grupos “-NH-” e “-Cl-” que aumentam sua densidade eletrônica por efeito de ressonância. O hidrogênio H2 é desblindado por efeito retirador por ressonância dos grupos R- $\text{SO}_2\text{NH-R}$  (SCHNEIDER *et al.* 1988).



**FIGURA 13** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz) da HTZ em  $\text{D}_2\text{O}$

#### 4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear dos compostos de inclusão Hidroclorotiazida/ $\beta$ -Ciclodextrina

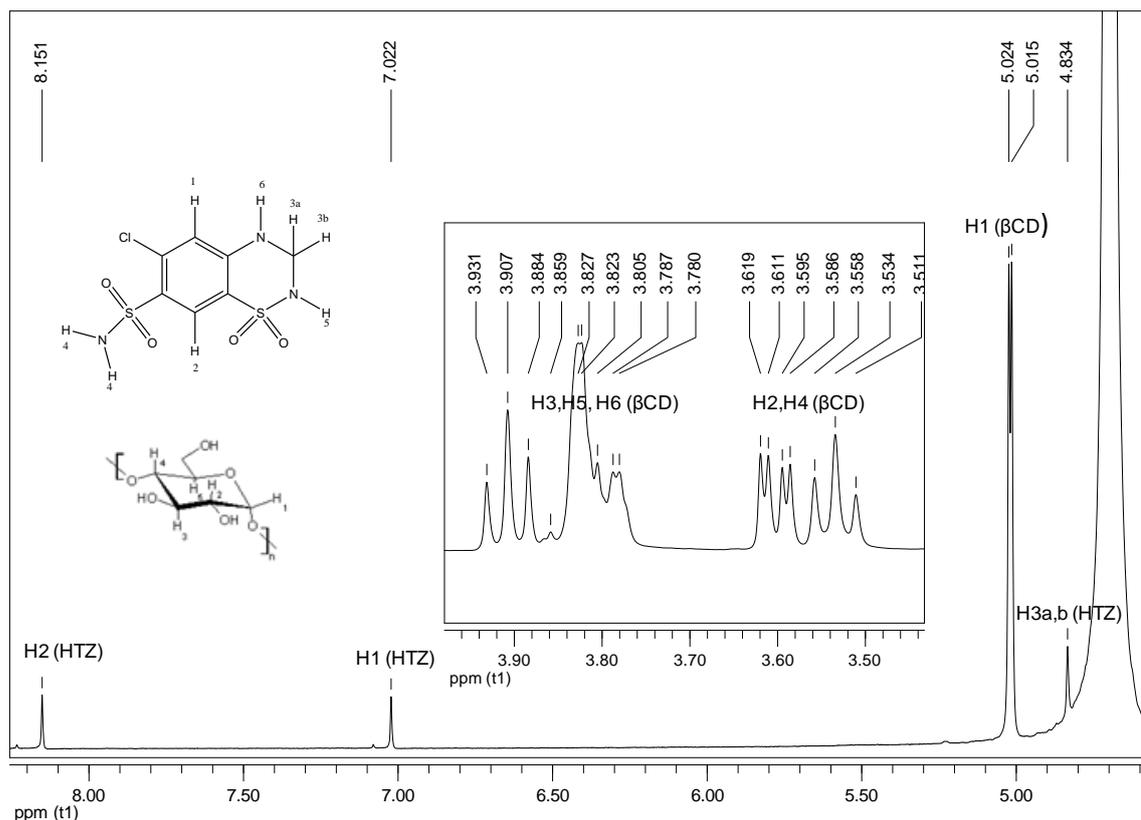
Modificações observadas nos espectros de RMN para hidrogênio dos compostos de inclusão têm sido relatadas na literatura, inclusive para HTZ: $\beta$ CD (DENADAI *et al.*, 2005). Estas variações de deslocamento químico aparecem em sinais de ressonância de hidrogênios da molécula hóspede que sofrem perturbações em seu ambiente químico e magnético devido à interação com a molécula hospedeira. Estas variações, algumas vezes, são suficientemente significativas para serem detectadas por RMN e podem servir de sonda em uma primeira análise do processo de complexação.

A FIGURA 13 (pág. 43) mostra espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e os valores de deslocamento químico da HTZ pura e na presença do composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtido pela técnica de liofilização, representativo dos compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtidos pelas diferentes técnicas. Cabe salientar que a diferença entre os espectros dos compostos de inclusão está nos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios da HTZ, os quais estão apresentados na TABELA 4. Observa-se que houve pequenas alterações de deslocamento químico dos  $^1\text{H}$  em relação ao sistema HTZ: $\beta$ CD, porém estes são maiores que os descritos na literatura.

**TABELA 3-** Valores de deslocamento químicos de alguns sinais de hidrogênios da HTZ e dos compostos de inclusão preparados por diferentes métodos (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Composto de Inclusão	Deslocamento Químico			
	$\delta\text{H1}$	$\Delta\delta$	$\delta\text{H2}$	$\Delta\delta$
$\delta$ HTZ PURA	7,046		8,214	
$\delta$ MF	7,009	-0,037	8,140	-0,074
$\delta$ LIOF	7,023	-0,023	8,152	-0,062
$\delta$ LF	7,010	-0,036	8,138	-0,076
$\delta$ SD	6,990	-0,056	8,128	-0,086

MF (mistura física), LIOF (liofilização), LF (leito fluidizado), SD (spray drying)



**FIGURA 14-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtido pela técnica de liofilização (LF), (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

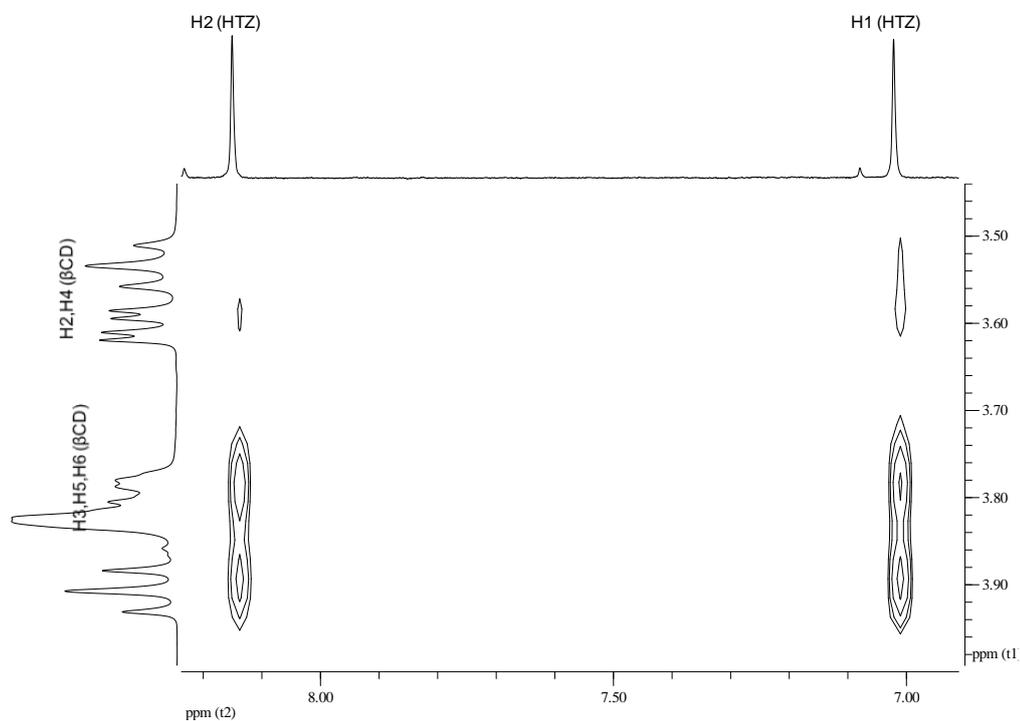
#### 4.1.2.2 ROESY

A fim de complementar os dados obtidos a partir da ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$ , foram feitos experimento de interação dipolar **ROESY** (*Rotating Frame Overhauser Spectroscopy*), para os diferentes sistemas estudados. ROESY mostra correlações indicativas de interação espacial entre núcleos que estejam a uma distância de até 5 Å permitindo confirmar possíveis interações entre os hidrogênios da HTZ com os hidrogênios da  $\beta$ -ciclodextrina (RAHMAN, 1989; DUPUY *et al.*, 2005; DUAN *et al.*, 2005).

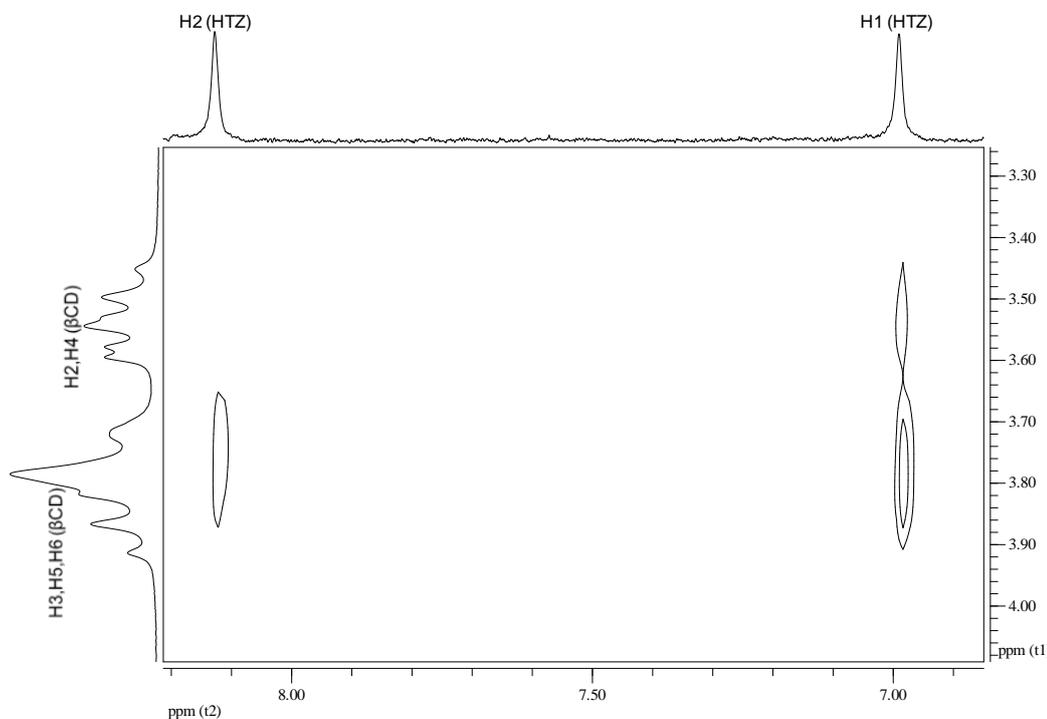
A análise dos mapas de contorno obtidos para os compostos LIOF, LF e SD mostrou correlações indicativas de interação espacial entre os hidrogênios da HTZ e  $\beta$ CD, confirmando os dados já apresentados de RMN  $^1\text{H}$ .

As FIGURAS 15, 16 e 17 apresentam os mapas de contornos ROESY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  400MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , para os diferentes compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtidos pelos diferentes métodos de preparação (liofilização, leite fluidizado, *spray-drying*). Esses mapas apresentam correlações indicativas de acoplamento dipolar indicando a interação entre moléculas hóspede e hospedeira. As interações observadas entre os hidrogênios H1 e H2

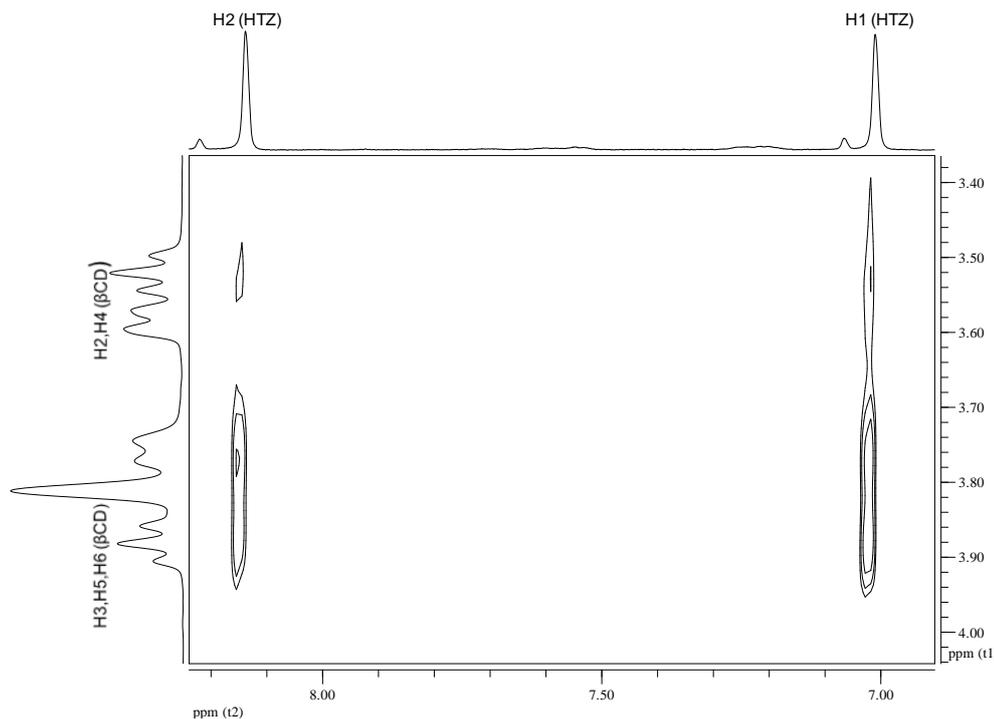
da HTZ e os hidrogênios H3,H5, somente são possíveis com a inclusão da molécula de HTZ na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina.



**FIGURA 15** – Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica liofilização (LIOF) (400 MHz, D<sub>2</sub>O)



**FIGURA 16** - Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica *spray drying* (SD) (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

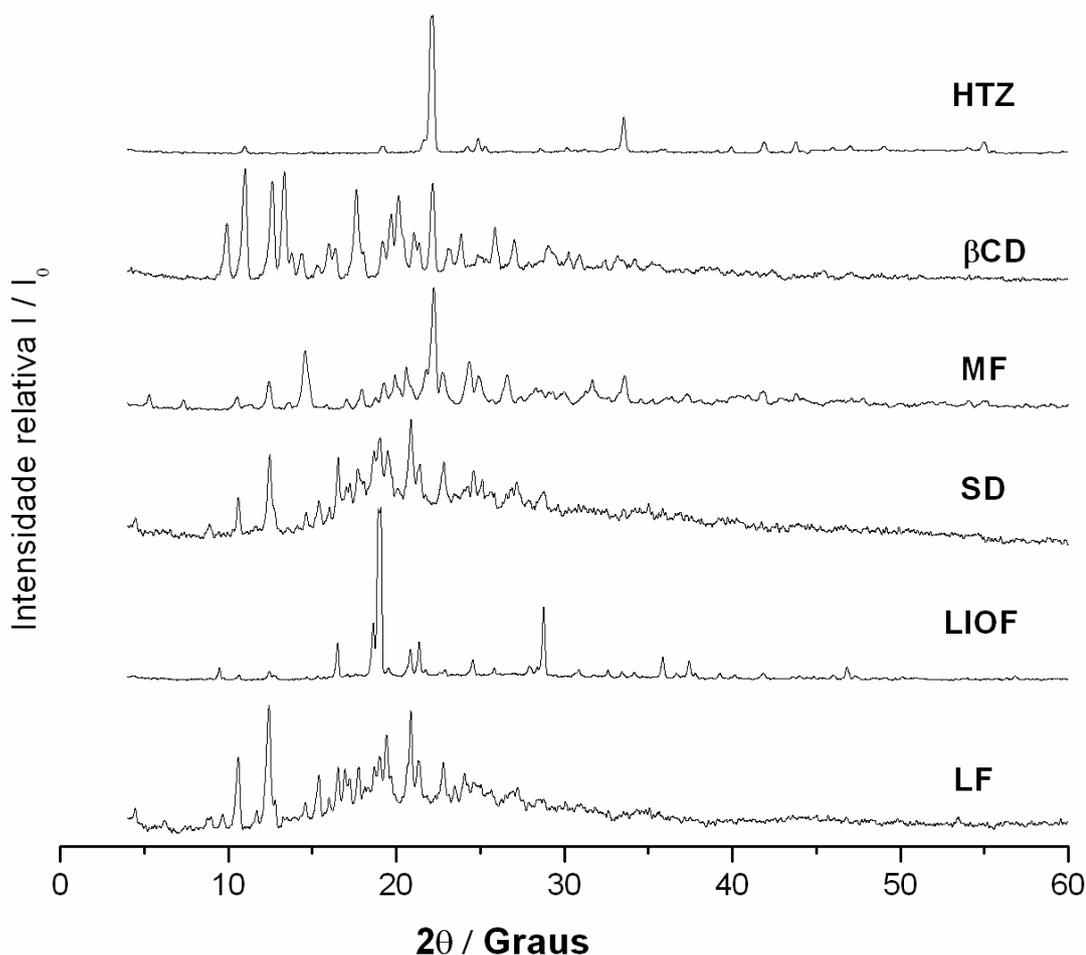


**FIGURA 17** - Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto de inclusão obtido pela técnica leito fluidizado (LF) (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

#### 4.1.3 – Difractometria de raios-X de pó

Os difratogramas de raios-X de pó para hidroclorotiazida,  $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de inclusão preparados pelos métodos *spray-drying*, liofilização e leito fluidizado são apresentados na FIGURA 18, na qual podem ser verificados os ângulos ( $2\theta$ ) e a intensidade relativa dos picos ( $I/I_0$ ).

Analisando os perfis de difração de DRX, verifica-se no difratograma da hidroclorotiazida que o fármaco apresenta-se como um composto cristalino, com um pico de intensidade máxima em  $2\theta = 22,2^\circ$ . O perfil de difração da  $\beta$ -ciclodextrina mostra-se policristalino, tendo as linhas características mais intensas de  $9,8^\circ$  a  $27,8^\circ$ . Já o difratograma da mistura física (MF) recentemente preparada mostra-se como a soma dos difratogramas individuais das duas substâncias e ainda é claro o pico característico da hidroclorotiazida em  $2\theta = 22,2^\circ$ , não ocorrendo deslocamento deste, sugerindo que não houve interação entre as duas espécies.



**FIGURA 18** - Difratoograma de Raios-X de pó para hidroclorotiazida (HTZ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF).

A análise dos perfis de difração de DRX dos compostos de inclusão obtidos pelas técnicas *spray drying* e leito fluidizado permite observar perfis semi-cristalinos semelhantes entre si, o que já era esperado uma vez que as duas técnicas são muito semelhantes, em contraste com os difratogramas da HTZ,  $\beta$ CD, MF e também do composto obtido por liofilização. Para o composto de inclusão preparado por liofilização o difratograma apresenta perfil diferente dos outros compostos de inclusão, percebendo-se também que houve interação entre a HTZ: $\beta$ CD uma vez que o pico característico da hidroclorotiazida em  $2\theta = 22,2^\circ$  apresenta-se deslocado para  $18,64^\circ$  em  $2\theta$ . Estes resultados estão de acordo com a maior solubilidade observada para os compostos SD e LF, em comparação com o complexo LIOF, uma vez que apresentam-se como substâncias semi cristalinas.

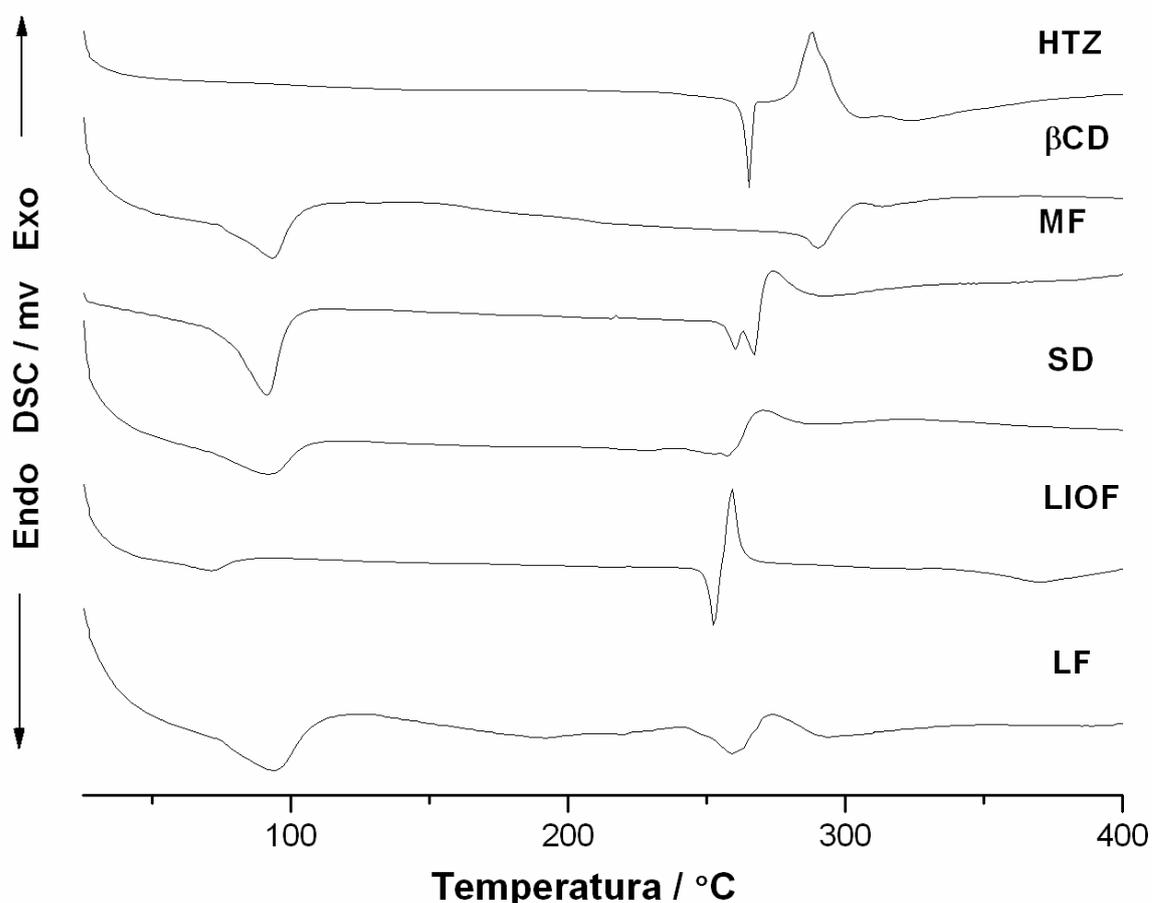
A literatura relata que as diferenças nas fases sólidas são responsáveis pelas diferenças na solubilidade do fármaco (ZHANGA *et al.*, 2004). Assim cristalinidade e amorficidade são fatores importantes, uma vez que devem estar relacionados com a solubilidade de compostos (ZHANGA *et al.*, 2004; ZANG *et al.*, 2009). Por exemplo, um material amorfo é mais reativo do que um cristalino, devido à sua maior atividade termodinâmica e, como consequência, materiais amorfos são considerados mais higroscópicos quando comparados aos sólidos cristalinos (ZHANGA *et al.*, 2004; ZANG *et al.*, 2009). Assim, os difratogramas de difração de raios X são muito úteis para determinar essas propriedades mas, no entanto, eles não fornecem uma forte evidência da formação de compostos de inclusão. Apesar disso, eles são úteis para monitorar mudanças na cristalinidade dos compostos.

#### 4.1.4. Análise Térmica

##### 4.1.4.1- Curvas de DSC

Evidências da formação dos complexos de inclusão foram obtidas a partir das curvas de análise térmica. A FIGURA 19 a seguir, apresenta as curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC -para HTZ,  $\beta$ CD, mistura física, e para os compostos SD, LIOF, LF.

A curva de DSC obtida para hidroclorotiazida apresenta um pico endotérmico em aproximadamente 270°C correspondente ao ponto de fusão do fármaco, de acordo com a literatura (MENON *et al.*, 2001). Esse pico endotérmico é seguido de outro pico exotérmico mais largo em aproximadamente 290°C que está associado à termodecomposição da HTZ. A  $\beta$ -ciclodextrina apresenta dois picos endotérmicos largos em torno de 100°C e 300°C, referentes à perda de água da cavidade da ciclodextrina e termodecomposição da molécula, respectivamente. Após o pico endotérmico de 300°C observa-se um ligeiro pico exotérmico em 308°C e outro endotérmico em 317°C, com posterior estabilização da linha de base. Os dados obtidos estão de acordo com a literatura (BETTINETTI, NOVAK e SORRENTI, 2002; KOHATA, KOUKI e AKIRSA, 1993; GIODARNO, NOVAK e MOYANO, 2001).



**FIGURA 19** - Curvas DSC para hidroclorotiazida (HTZ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF).

O perfil térmico obtido para a mistura física mostra um pico endotérmico em torno de 100°C verificado para a  $\beta$ CD e também dois eventos entre 270-275°C correspondentes à fusão da HTZ.

Entretanto, ao analisar os perfis referentes aos três compostos de inclusão SD, LIOF e LF, é possível verificar que os perfis térmicos da hidroclorotiazida e da  $\beta$ -ciclodextrina foram descaracterizados, cedendo lugar a novos perfis térmicos que apresentam picos endotérmicos e exotérmicos de larguras diferentes e em faixas de temperatura diferentes das substâncias puras originais. A descaracterização da curva é mais nítida para os compostos obtidos pela técnica de atomização (SD e LF). O desaparecimento do pico de fusão ou a alteração da faixa de fusão do fármaco auxilia o monitoramento da interação hóspede hospedeiro.

A curva obtida para o composto LIOF mostra um evento endotérmico em 250°C, ou seja, uma redução na faixa de temperatura de fusão da HTZ, sugestivo da presença da Hidroclorotiazida +  $\beta$ -ciclodextrina (mistura física) junto do composto de inclusão.

Esses resultados sugerem a existência de três compostos diferentes da hidroclorotiazida, formados a partir dos diferentes métodos empregados para eliminação do solvente. A alteração das curvas sugere claramente a existência de uma forte interação hospede – hospedeiro.

#### 4.1.4.2 – Curvas de TG/DTG

As curvas TG e de DTG para HTZ,  $\beta$ CD, MF e os três complexos de inclusão são mostrados na FIGURA 20. A curva para HTZ apresenta um perfil de estabilidade até 290°C seguida de uma perda de massa de 50% (KOHATA, KOUKI e AKIRSA, 1993).

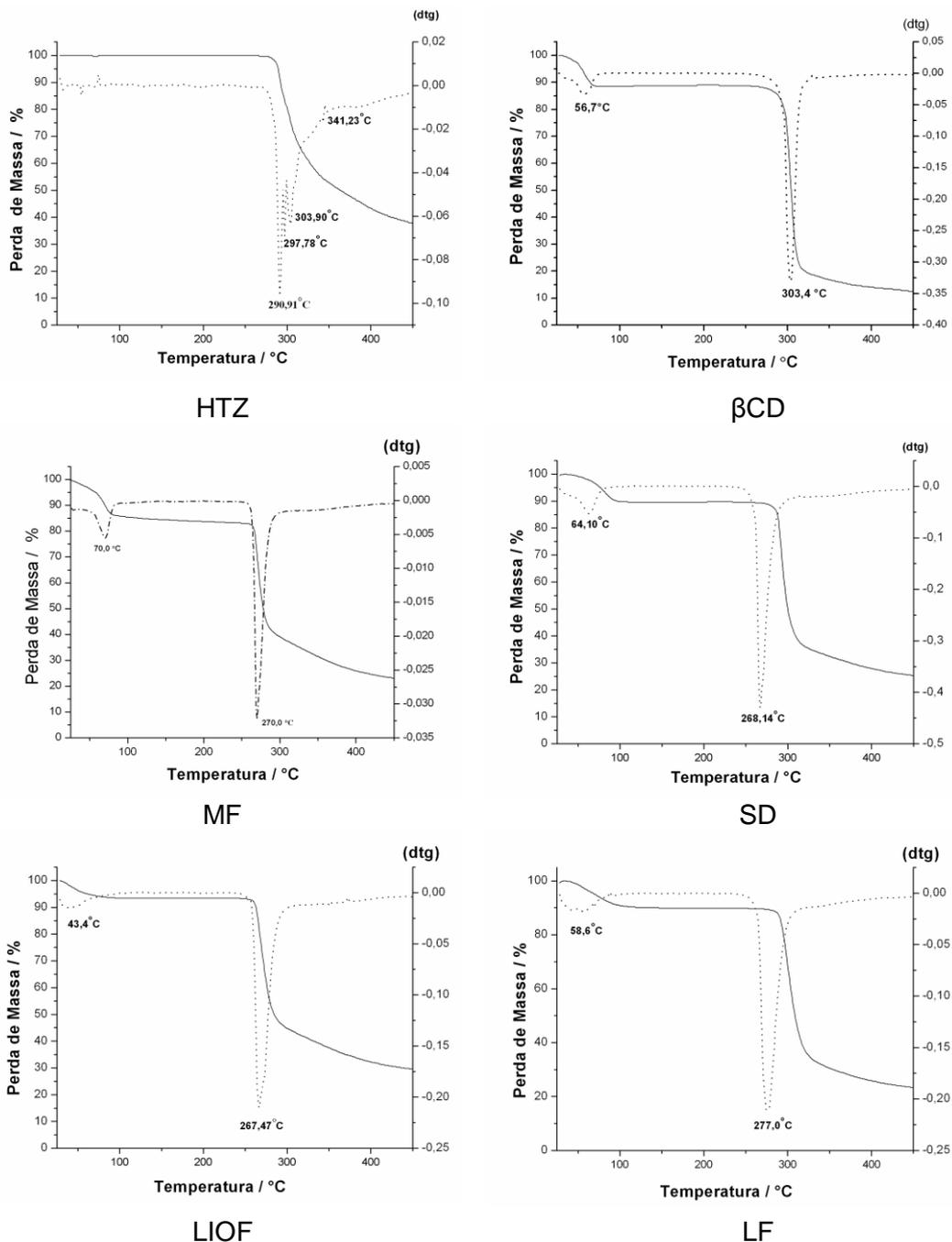
A curva TG para  $\beta$ CD apresentou dois eventos térmicos: um em torno de 70°C com uma perda de massa em 15%, referente à perda de oito moléculas de água presentes na cavidade da  $\beta$ CD, e um segundo entre 300-350°C referente à total decomposição térmica da molécula (ORGAVÁNYI *et al.*, 2005; GIODARNO, NOVAK e MOYANO, 2001).

A mistura física (MF) apresentou uma perda de massa de 15% a cerca de 70 °C, relacionada com a perda de água da cavidade da ciclodextrina, a mesma observada na curva de  $\beta$ CD, seguida de mais uma perda de 50% em massa na faixa de 270°C, relativa à HTZ.

Perfis similares de decomposição térmica para os três compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD foram verificados. Observa-se uma perda de massa em torno de 10% na faixa entre 40-70°C correspondente à saída de água da cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina, e outro entre 260 a 290°C correspondendo a uma perda de 60 a 70%, o que pode ser atribuído ao primeiro estágio de decomposição térmica dos compostos SD, LIOF e LF.

O composto SD apresenta pico de decomposição principal mais fino, quando comparado a LIOF e LF, sugerindo maior velocidade decomposição.

É interessante notar que o perfil térmico apresentado para a mistura física é muito semelhante aos dos três compostos de inclusão, o que sugere possíveis interações entre as moléculas, mesmo no estado sólido.



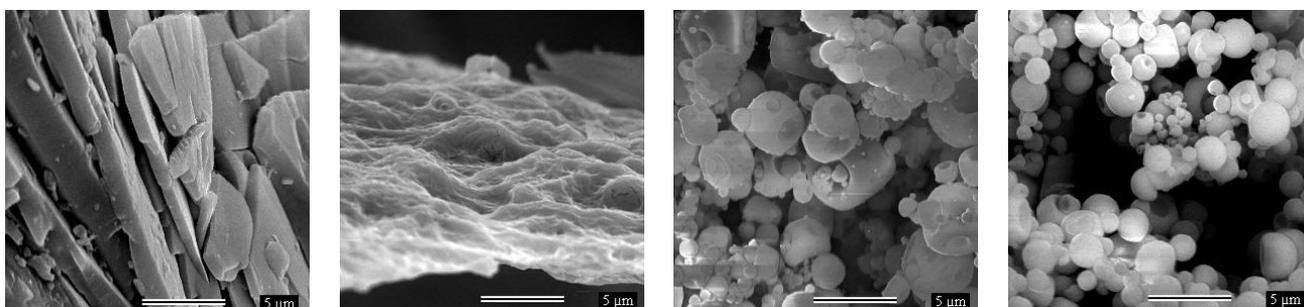
**FIGURA 20** - Curvas de TG/DTG para HTZ, βCD, mistura física (MF), e compostos obtidos por liofilização (LIOF), spray drying (SD), leito fluidizado (LF).

#### 4.1.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de verificar a morfologia das partículas realizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para HTZ pura e para os compostos de inclusão, LIOF, LF e SD. As micrografias obtidas são mostradas na FIGURA 21.

Observou-se que a hidroclorotiazida apresentou cristais grandes e irregulares, enquanto o composto obtido por liofilização (LIOF) apresentou aspecto característico amorfo e com alguma porosidade. Em contrapartida, os compostos obtidos pelas técnicas de leito fluidizado e *spray drying* apresentaram partículas esféricas e também com alguma porosidade na superfície. No entanto, as partículas obtidas pela SD apresentam-se com morfologia externa mais regular e menores que as partículas formadas por LF.

Esses resultados sugerem que a técnica utilizada para secagem do composto de inclusão influencia diretamente a morfologia da partícula, bem como o seu tamanho e os mesmos estão de acordo com o descrito na literatura, onde se verifica que o tempo e velocidade de secagem dos compostos de inclusão obtidos por *spray drying* e leito fluidizado podem modificar a morfologia dos compostos (ZANG *et al.*, 2009).



HTZ

LIOF

LF

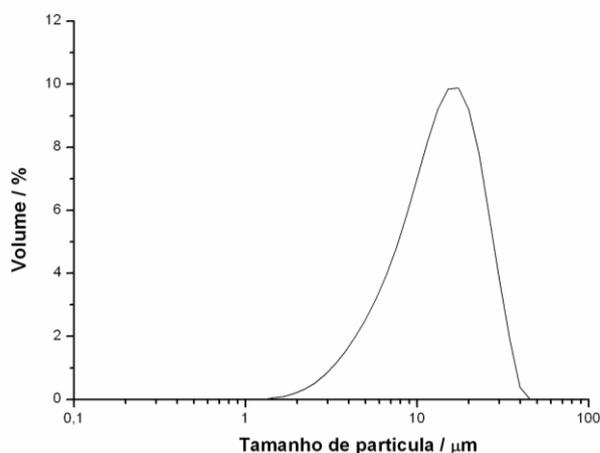
SD

**FIGURA 21** - Fotomicrografias de HTZ, e seus compostos de inclusão obtidos pelas técnicas de *spray drying* (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF), aumento de 5000 x.

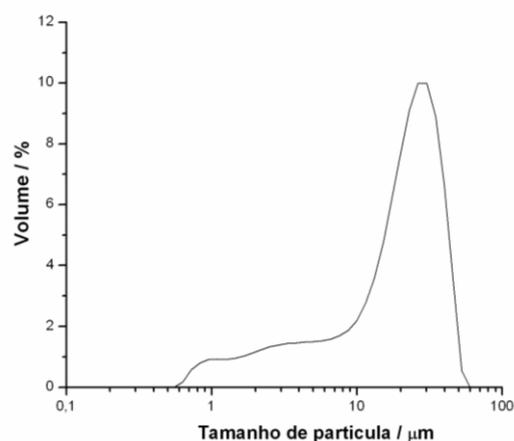
#### 4.1.6 - Análise De Tamanho De Partículas

Os resultados experimentais para a determinação da distribuição do tamanho das partículas para HTZ e seus compostos de inclusão preparados pelos métodos *spray drying*, liofilização e leito fluidizado são apresentados na FIGURA 22 em forma de curvas de distribuição granulométrica.

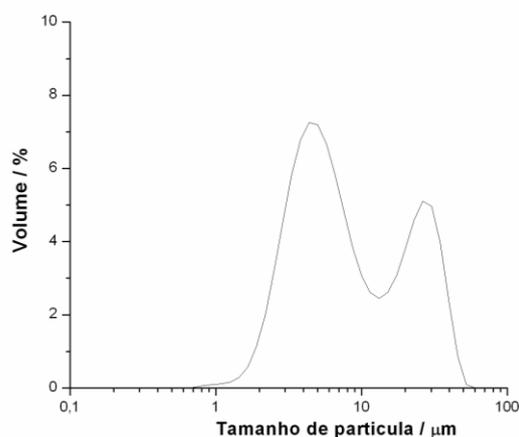
Observa-se que a HTZ pura apresenta uma curva unimodal, apresentando 90% das partículas com tamanho inferior a  $27 \mu\text{m}$ , enquanto o composto de inclusão HTZ: $\beta$ CD obtido pela técnica liofilização apresenta um tamanho de partícula superior ao da HTZ, sendo 90% das partículas com tamanho inferior a  $32 \mu\text{m}$ . Por outro lado, com relação à análise da distribuição granulométrica para os compostos SD e LF observa-se uma curva bimodal com duas populações de tamanho de partículas, sendo 90% do tamanho das partículas compreendido entre 17 e  $32 \mu\text{m}$ , respectivamente.



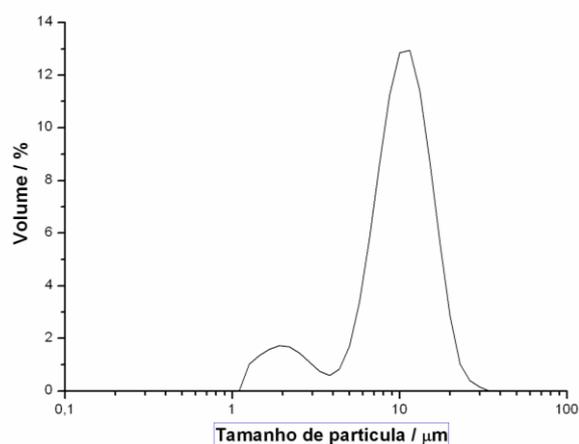
HTZ



LIOF



SD



LF

**FIGURA 22** - Distribuição do tamanho da partícula para HTZ e seus compostos de inclusão obtidos pelas diferentes técnicas, liofilização (LIOF),

#### 4.1.7 – Estudos de Dissolução

##### 4.1.7.1 - Dissolução intrínseca

A dissolução intrínseca é uma ferramenta bastante interessante no desenvolvimento de pré formulação de uma forma farmacêutica sólida para fármacos pouco solúveis. A sua avaliação está baseada na determinação da velocidade de dissolução intrínseca (IDR) quando o fármaco puro é compactado e submetido a um ensaio de dissolução, mantendo-se constante a sua superfície de exposição (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009). Fatores inerentes ao fármaco, como estrutura cristalina, polimorfismo e tamanho de partícula podem influenciar na velocidade de dissolução intrínseca do fármaco.

Neste contexto a dissolução intrínseca torna-se uma ferramenta importante nos estudos *in vitro*, uma vez que permite avaliar a melhora na solubilidade dos fármacos que apresentam baixa solubilidade no trato gastrointestinal. Este ensaio evidencia não somente os incrementos de solubilidade intrínseca conseguidos pela encapsulação molecular do fármaco, mas também permite o estudo cinético da liberação (BLAGDEN *et al.*, 2007). Ao aplicar o método de discos rotativos, a taxa de dissolução é avaliada segundo as condições de fluxo laminar convectivo e área da superfície constante, que é geralmente expressa em miligramas dissolvidas por minuto por centímetro quadrado (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008).

Assim a dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida entra em contato com o solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação do fármaco em um volume conhecido de meio num determinado tempo (COSTA e LOBO, 1999).

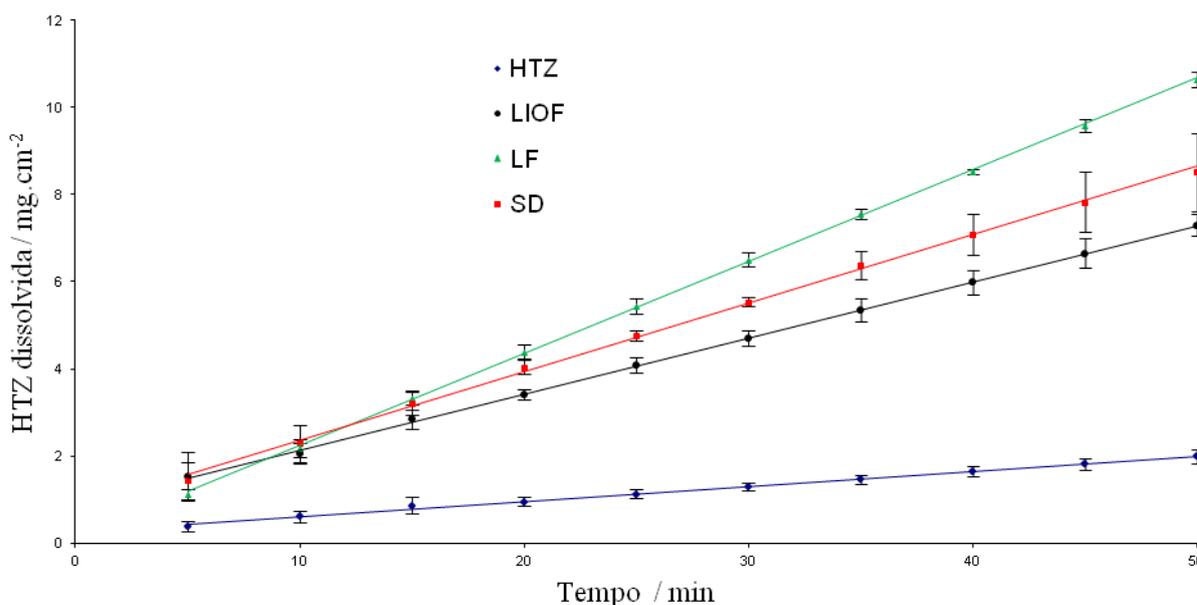
Diante do exposto acima é interessante avaliar os compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD, a fim de verificar o possível ganho na velocidade de dissolução do fármaco. Os perfis de dissolução da HTZ pura e os três compostos de inclusão foram realizados em fluido gástrico simulado (pH 1,2) e estão demonstrados na FIGURA 23, e os resultados da dissolução intrínseca estão apresentados na TABELA 5.

**TABELA 4** - Regressão Linear, coeficiente de correlação linear (R) e Eficiência da Dissolução Intrínseca para HTZ e compostos de inclusão obtidos por spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF)\*

	Equação Linear	R	Eficiência da Dissolução Intrínseca (mg.min <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )
HTZ	Y = 0,0345x + 0,2718	0,9960	0,040 ± (0,003 <sup>a</sup> )
SD	Y = 0,1571x + 0,7908	0,9986	0,170 ± (0,018 <sup>a</sup> )
LIOF	Y = 0,1287x + 0,8545	0,9996	0,146 ± (0,005 <sup>a</sup> )
LF	Y = 0,2109x + 0,1278	0,9998	0,213 ± (0,004 <sup>a</sup> )

\*O número de amostras foi igual a 4; <sup>a</sup>s= desvio padrão

Os resultados obtidos para o estudo de dissolução intrínseca da HTZ pura e compostos de inclusão demonstraram que a presença da ciclodextrina associada ao fármaco proporcionou um ganho significativo de solubilidade para o mesmo. Os compostos de inclusão LF, SD e LIOF apresentaram uma taxa de dissolução de 5,3, 4,3 e 2,4 vezes maior, respectivamente, quando comparadas com a taxa de dissolução da HTZ.



**FIGURA 23** - Dissolução intrínseca para hidroclorotiazida e compostos de inclusão obtidos spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leito fluidizado (LF)

Interessante notar que os compostos de inclusão LF e SD apresentaram uma taxa de dissolução ao final de 50 minutos maior que o composto LIOF. Isto pode ser devido ao tamanho e morfologia das partículas serem muito semelhantes, o que pode ser confirmado pelos resultados de microscopia eletrônica de varredura. Como discutido anteriormente, os compostos foram preparados por técnicas diferentes, podendo levar à obtenção das partículas com morfologia diferente. De acordo com a literatura, granulometria e morfologia

das partículas de um composto são fatores essenciais para a sua taxa de dissolução (ZHANG *et al.*, 2004). Assim o aumento da velocidade de dissolução torna-se interessante, uma vez que uma solubilização mais rápida do fármaco no trato gastro intestinal pode levar a um aumento na biodisponibilidade do mesmo. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que o processo de inclusão teve um papel fundamental no aumento da solubilidade da HTZ.

Estudos de dissolução intrínseca têm sido utilizados para demonstrar ganhos de solubilidade de fármacos quando incluídos na cavidade das ciclodextrinas, por exemplo: estudos realizados com meloxicam complexado com  $\beta$ CD, através dos métodos pasta e *spray drying* demonstraram aumento significativo na velocidade de dissolução; o mesmo foi demonstrado para o piroxicam, verificando-se um aumento de 4,8 vezes em relação ao fármaco puro (THE NINTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS, 1999; VAN HEES *et al.*, 2002).

#### 4.1.7.2 – Estudos da dissolução em cápsulas de HTZ e compostos de inclusão HTZ: $\beta$ CD

A dissolução de medicamentos envolve pelo menos dois passos consecutivos: liberação do soluto da matriz e solubilização das partículas do fármaco no meio. As propriedades coesivas da formulação representam um importante papel na primeira etapa da dissolução. Para as formas de dosagem sólidas essas propriedades incluem a desintegração, erosão e a desagregação (BROW *et al.*, 2004).

Importante mencionar ainda que a dissolução final do fármaco no organismo pode ser influenciada pelas características físico-químicas da substância ativa, pelo meio de dissolução e também pela formulação, englobando a natureza dos excipientes e o processo produtivo (YU *et al.*, 2004). Diante disto, torna-se imprescindível avaliar a dissolução dos compostos de inclusão na presença de excipientes farmacêuticos. Por isso, prepararam-se cápsulas contendo compostos de inclusão (HTZ: $\beta$ CD) mais excipientes farmacêuticos, e os resultados da dissolução do fármaco em função do tempo foram plotados na FIGURA 24.

Analisando as curvas de dissolução verifica-se que a taxa de dissolução continua consideravelmente aumentada para HTZ, mesmo na presença de outros excipientes (hidroclorotiazida 25 mg cápsula).

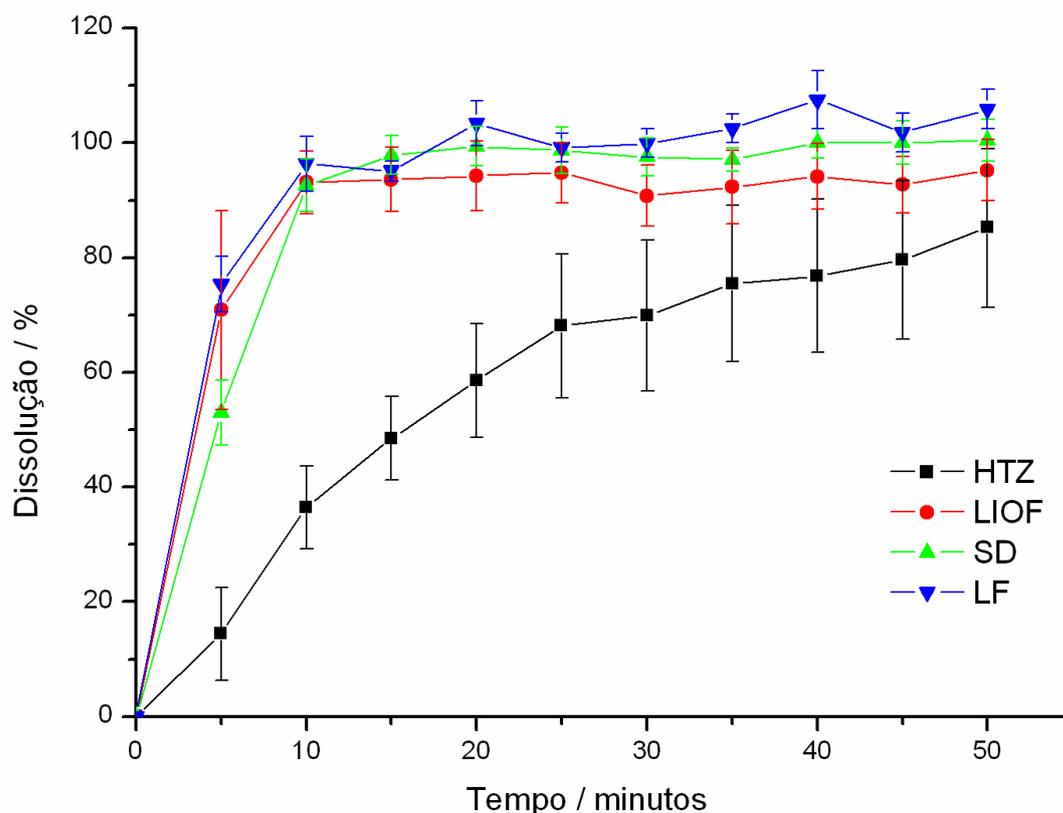
De acordo com as curvas de liberação, referentes as cápsulas contendo os compostos de inclusão, continuaram a apresentar uma dissolução superior ao do fármaco desde os primeiros minutos de liberação.

Enquanto a HTZ apresenta um percentual de liberação inferior a 20%, as cápsulas apresentaram liberação superior a 50%.

Observa-se que enquanto nos primeiros 10 minutos a HTZ apresenta percentual de liberação inferior a 40%, as cápsulas apresentam liberação superior a 90% para todas as formulações, valor inclusive superior ao último ponto de coleta da HTZ livre em 50 minutos, em torno de 80%.

Observa-se que cápsulas de HTZ: $\beta$ CD preparadas com os compostos de inclusão obtidos por leite fluidizado, spray drying e liofilização apresentaram um perfil de liberação do fármaco muito semelhante, sugerindo que a inclusão do fármaco, independentemente da técnica, traz um ganho expressivo na sua velocidade de dissolução e que os excipientes farmacêuticos utilizados não interferiram no ganho de solubilidade da HTZ.

Embora os perfis de dissolução para os três compostos não sejam estatisticamente diferentes, o composto obtido por LF apresentou maiores valores de dissolução quando comparado a SD e LIOF, corroborando com todos os resultados discutidos anteriormente, sugerindo uma inclusão mais efetiva.



**FIGURA 24** - Perfil de dissolução para hidroclorotiazida (HTZ) e formulações preparadas a partir dos compostos de inclusão obtidos por spray drying (SD), liofilização (LIOF) e leite fluidizado (LF) (n= 4).

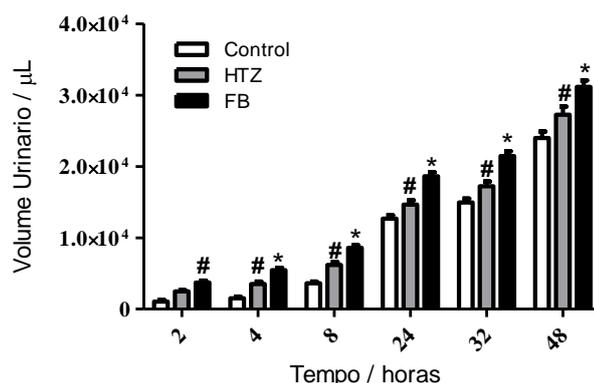
#### 4.1.8. Ensaio Biológico

Baseado nos resultados de caracterização dos compostos de inclusão obtidos pelos três diferentes métodos e também nos resultados de dissolução intrínseca, o composto LF foi escolhido para fazer o teste de atividade biológica, uma vez que mostrou-se o mais efetivo quanto ao processo de inclusão e apresentou maior velocidade de dissolução.

Durante a condução do estudo *in vivo*, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas para adaptação 48 horas antes da administração oral de água, fármaco e composto de inclusão. A urina coletada antes da administração oral foi descartada. Após administração oral, coletou-se urina dos animais após 2, 4, 8, 24, 32 e 48 horas. Neste período de 48 horas avaliou-se o volume urinário acumulativo, sódio e a osmolalidade na urina. Interessante mencionar que a quantificação de íons sódio e cloreto na urina é um dos melhores métodos para determinar o efeito diurético de fármaco (OPIE e KAPLAN, 1991; FIELD, STANTATON e GIEBISCH, 1984). Os resultados são demonstrados nas FIGURAS 25, 26 e 27 a seguir.

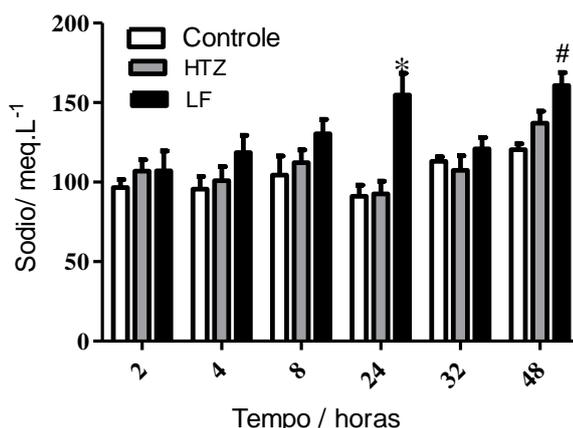
O fármaco e o composto de inclusão foram dispersos em 1 mL de água antes da administração oral. A dose administrada de hidroclorotiazida foi de 10mg (MOUGENOT *et al.*, 2005, MATERSON *et al.*, 2007), e a do composto de inclusão foi 38 mg.Kg<sup>-1</sup>, correspondente a 10 mg de HTZ. A FIGURA 25 mostra os volumes urinários acumulados para os grupos controle, HTZ e LF. Observa-se, com a administração de dose única da hidroclorotiazida, um aumento do volume urinário em relação ao grupo controle. Esse efeito diurético foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle após quatro horas, e o mesmo efeito foi mantido até 48 horas ( $p < 0,05$ ).

Por outro lado, o composto de inclusão apresentou um aumento do efeito diurético já nas primeiras 2 horas após a administração, sendo estatisticamente diferente do grupo controle. Observamos também, o efeito diurético do composto de inclusão foi significativamente diferente em relação a HTZ e ao grupo controle no período de 4 a 48 horas ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 25** - Volume urinário de ratos Wistar após administração oral de 1 mL água de destilada (controle), uma dose de HTZ ( $10\text{mg.kg}^{-1}$ ) e composto de inclusão LF ( $38\text{mg.kg}^{-1}$ ), foi mensurado em 2, 4, 8, 24, 32 e 48 h. Os valores acumulados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M de doze ratos em cada grupo (# estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ,  $p < 0,05$ ).

A FIGURA 26 mostra os valores de sódio excretado na urina acumulada. Os dados mostraram um aumento de sódio excretado no grupo que recebeu LF já nas primeiras horas, porém só foi verificada diferença estatística significativa entre os valores de eletrólitos do grupo controle e HTZ após 24 horas de administração. Este efeito também foi observado para o LF em relação ao controle após 48 horas.

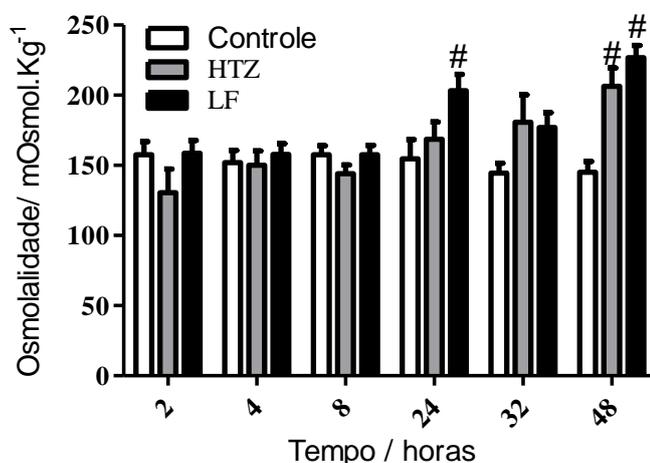


**FIGURA 26** - Volume de sódio excretado na urina de ratos Wistar após administração oral de 1 mL de água destilada (grupo controle), de uma dose de HTZ ( $10\text{mg.kg}^{-1}$ ) e composto de inclusão LF ( $38\text{mg.kg}^{-1}$ ), mensurados em 2, 4, 8, 24, 32 e 48 h. Os valores são apresentados como média  $\pm$  SEM de doze ratos em cada grupo (# estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ,  $p < 0,05$ ).

A FIGURA 27 apresenta os valores de osmolalidade na urina excretada pelos ratos. Os mesmos estão de acordo com os valores obtidos para sódio, uma vez que se apresentaram estatisticamente diferentes para HTZ em 48 horas e para LF nos tempos 24 e 48 horas em comparação ao grupo controle.

Baseado nas caracterizações físico-químicas realizadas e nos resultados de atividade diurética da HTZ livre e associada à ciclodextrina, observaram-se modificações nas propriedades físico-químicas da hidroclorotiazida e também um aumento ou uma antecipação da atividade farmacológica considerando doses equimolares da HTZ, no mesmo tempo.

O aumento da solubilidade, conforme evidenciado pelos estudos de dissolução intrínseca, e da biodisponibilidade, evidenciado pelos estudos *in vivo*, podem estar relacionados à efetiva inclusão da HTZ na cavidade da  $\beta$ CD. Aumentos de solubilidade de fármacos promovidos pela presença de CD já foram previamente relatados em literatura (JENSEN *et al.* 2010; LOFTSSON e DUCHENE, 2007), incluindo diuréticos como, por exemplo, a espironolactona (KAUKONEM, LENNERMANS e MANNERMAN,1998).



**FIGURA 27** - A osmolalidade na urina de ratos *wistar* após administração oral de água destilada (grupo controle), de uma dose de HTZ ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e composto de inclusão LF ( $38 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Os valores acumulados são apresentados como média  $\pm$  SEM de doze ratos em cada grupo, (# estatisticamente diferente do grupo controle e \* estatisticamente diferente dos grupos controle e HTZ,  $p < 0,05$ ).

A solubilidade é uma característica crucial para aumento da biodisponibilidade de fármacos classe II e IV, de acordo com a Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*,

1995). Esses fármacos têm problemas de dissolução no TGI e com a sua inclusão em  $\beta$ CD, consegue-se um aumento da solubilidade, o que faz aumentar o número de moléculas solubilizadas na luz intestinal.

Diante disso a literatura relata que as ciclodextrinas e seus compostos de inclusão desempenham um papel importante na melhoria da biodisponibilidade dos fármacos de baixa solubilidade, como HTZ, com base no aumento de sua solubilidade e, provavelmente, uma maior permeabilidade (LOFTSSON, 2002).

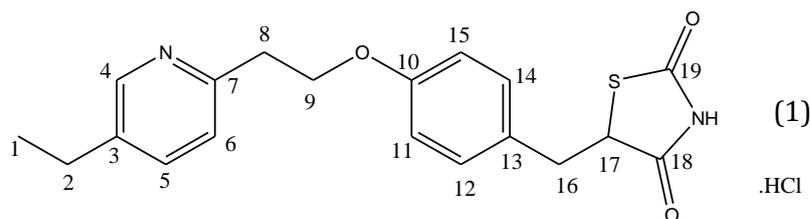
De acordo com a lei de Fick esta elevação de concentração na luz intestinal tem relação direta com a absorção passiva do fármaco, pois este fenômeno de permeação é dependente do gradiente de concentração, da cinética molecular e do choque intermolecular das espécies dissolvidas, o que garante maior absorção (LOFTSSON, 2002).

Formulações farmacêuticas utilizando o complexo entre HTZ: $\beta$ CD promoveram de uma maneira relativamente simples uma alternativa para o aumento da solubilidade da HTZ, conforme estudo de dissolução em cápsulas. Esta seria então uma excelente alternativa para possíveis estudos de redução de dose, ou mesmo preparação de formulações administradas em intervalos maiores, conforme preconizado pelas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) no que concerne ao aumento da adesão a tratamentos crônicos.

A fim de confirmar se o aumento da biodisponibilidade da HTZ está também relacionado ao aumento da permeabilidade do fármaco, estudos de permeação utilizando modelos de células, bem como estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade deverão ser desenvolvidos em trabalhos futuros.

## 4.2 Cloridrato de pioglitazona, $\beta$ -ciclodextrina, Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de inclusão

Cloridrato de pioglitazona (**1**) foi caracterizado por meio de métodos convencionais de análise, como espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), análise térmica (TG/DTG/DTA e DSC), difração de raios-X de pó e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizando técnicas modernas uni- e bidimensionais.



Para o fármaco cloridrato de pioglitazona foram preparadas formulações com  $\beta$ -ciclodextrina e HP $\beta$ -ciclodextrina pela técnica de *spray drying* na proporção molar de 1:1.

### 4.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho referentes ao cloridrato de pioglitazona,  $\beta$ -ciclodextrina, HP $\beta$ -ciclodextrina, mistura física e compostos obtidos pela técnica de *spray drying* estão apresentados nas FIGURAS 28 e 29. As atribuições das principais frequências de vibração das moléculas foram feitas com o auxílio da literatura (SILVERSTEIN e BASSLER, 2007).

No espectro de infravermelho do cloridrato de pioglitazona, FIGURAS 28 e 29, observam-se bandas de vibração referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H de carbonos alifáticos ( $\nu_{\text{ass}} \text{CH}_3, \text{CH}_2$ ), entre  $2930 \text{ cm}^{-1}$  e aproximadamente  $2615 \text{ cm}^{-1}$ . Em  $3091 \text{ cm}^{-1}$  observa-se a absorção atribuída à estiramento de C-H de aromático.

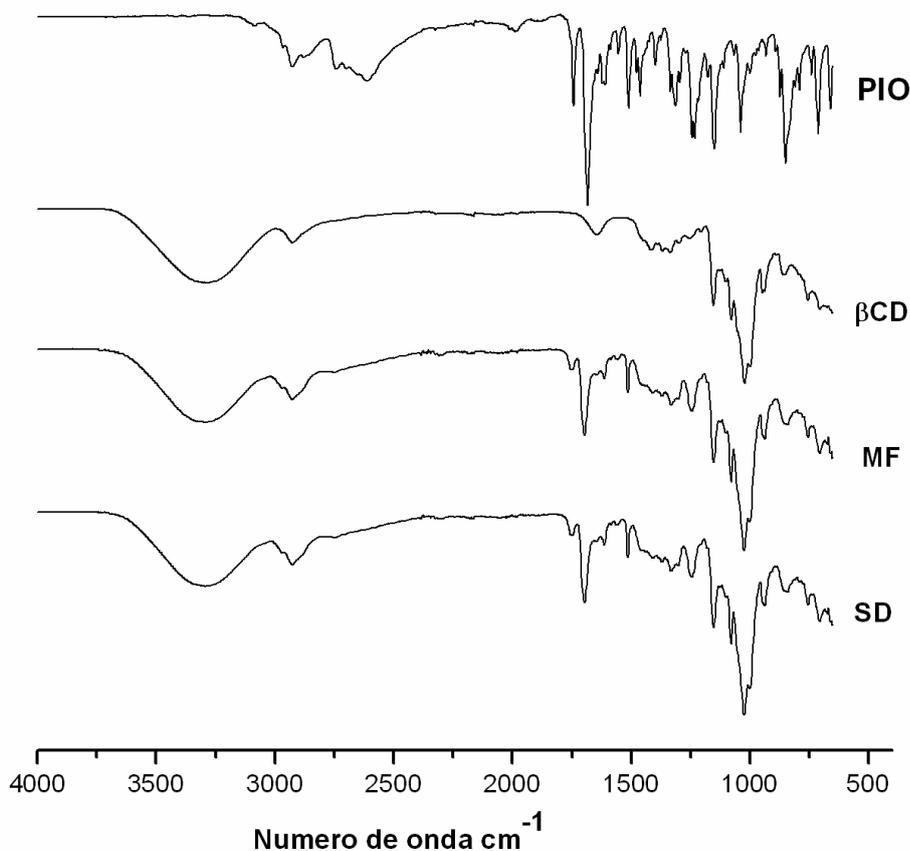
Observam-se ainda bandas em  $1745 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento do grupo C=O da imida, uma banda em  $708 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial C-N, e em  $847 \text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação angular simétrica fora do plano de N-H. São atribuídas ainda as absorções referentes às vibrações C-O de éster e de C-S em  $1041 \text{ cm}^{-1}$  e  $650 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Os dados encontrados estão de acordo com os da literatura (GAJARE *et al.*, 2009).

As bandas de absorção mais características da  $\beta$ -ciclodextrina foram apresentadas e discutidas anteriormente (seção 4.1, páginas 41 e 42). As principais bandas características da HP $\beta$ CD são os estiramentos O-H, em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , estiramentos C-H em  $2900\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular O-H da água, em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular C-H, em torno de  $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C-O-C em torno de  $1050\text{ cm}^{-1}$ , e deformação angular O-H na região de  $500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  (ANTONIADOU *et al.*, 1997).

Analisando o espectro do cloridrato de pioglitazona puro nas FIGURAS 28 e 29 frente aos espectros dos compostos de inclusão, observa-se uma perda de resolução em bandas típicas da PIO, observadas em  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2615\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a C-H de carbonos alifáticos e em  $3091\text{ cm}^{-1}$  referente a carbonos aromáticos.

Na região de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , pode ser observado nos espectros dos compostos PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD uma simples superposição de bandas referentes a PIO e  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, relacionadas a hidroxilas da cavidade da CD e vibração C = O referente à molécula da PIO.

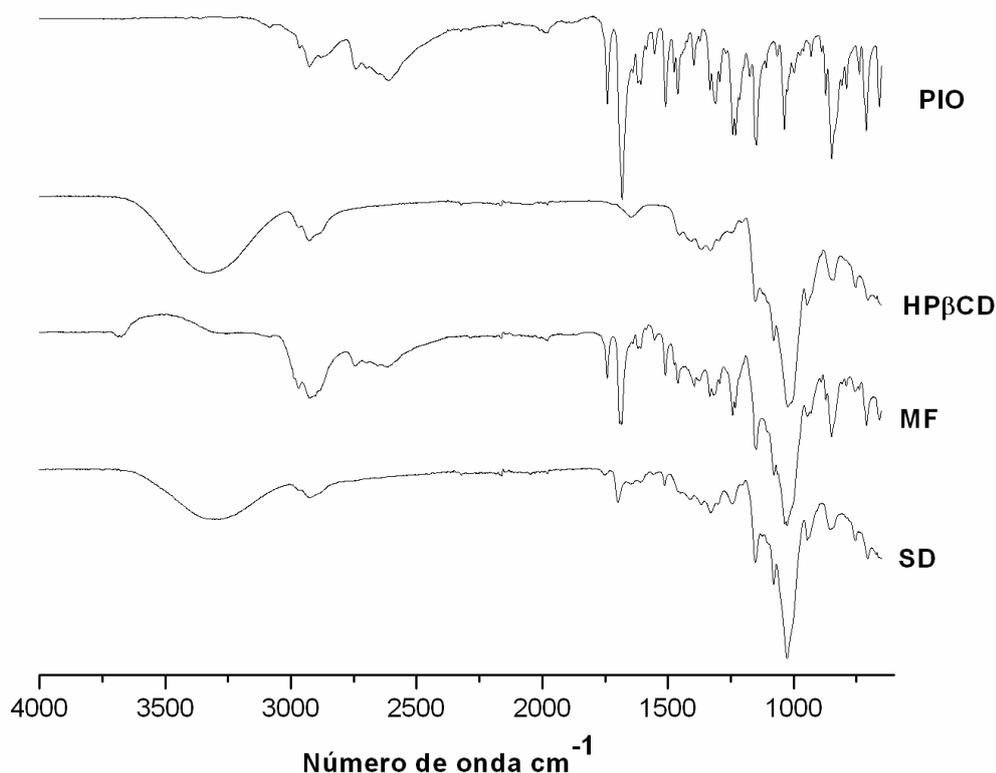
De um modo geral as bandas do cloridrato de pioglitazona entre  $3093$  a  $2611\text{ cm}^{-1}$  não aparecem nos espectros dos compostos de inclusão, enquanto a banda em  $1686\text{ cm}^{-1}$  correspondente à carbonila C=O aparece com menor intensidade, ainda com um ombro junto à banda em torno  $1756\text{ cm}^{-1}$ .



**FIGURA 28** - Espectros de absorção na região do infravermelho para cloridrato de pioglitazona (PIO),  $\beta$  - ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica *spray drying* (SD).

Também podem ser observados nos espectros dos compostos de inclusão um afinamento e um deslocamento da banda na região de 1200-900 cm<sup>-1</sup> e desaparecimento da banda em 1640 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação de grupo -OH ( $\delta_{OH}$ ) de moléculas de água complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina. Tais fatos sugerem a formação dos compostos devido à perda de água da cavidade da CD e posterior inclusão da PIO.

Os resultados dos espectros referentes às misturas físicas PIO+HP $\beta$ CD e PIO+ $\beta$ CD mostram que não há interação no estado sólido, e os espectros referentes aos compostos de inclusão são muito semelhantes entre si, sugerindo que a técnica de infravermelho neste caso não foi a técnica mais adequada à confirmação da inclusão do fármaco na cavidade das ciclodextrinas.



**FIGURA 29** - Espectros de absorção na região do infravermelho para cloridrato de pioglitazona (PIO), HP $\beta$  – ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e composto de inclusão obtido pela técnica *spray drying* (SD).

#### 4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear para os compostos de inclusão

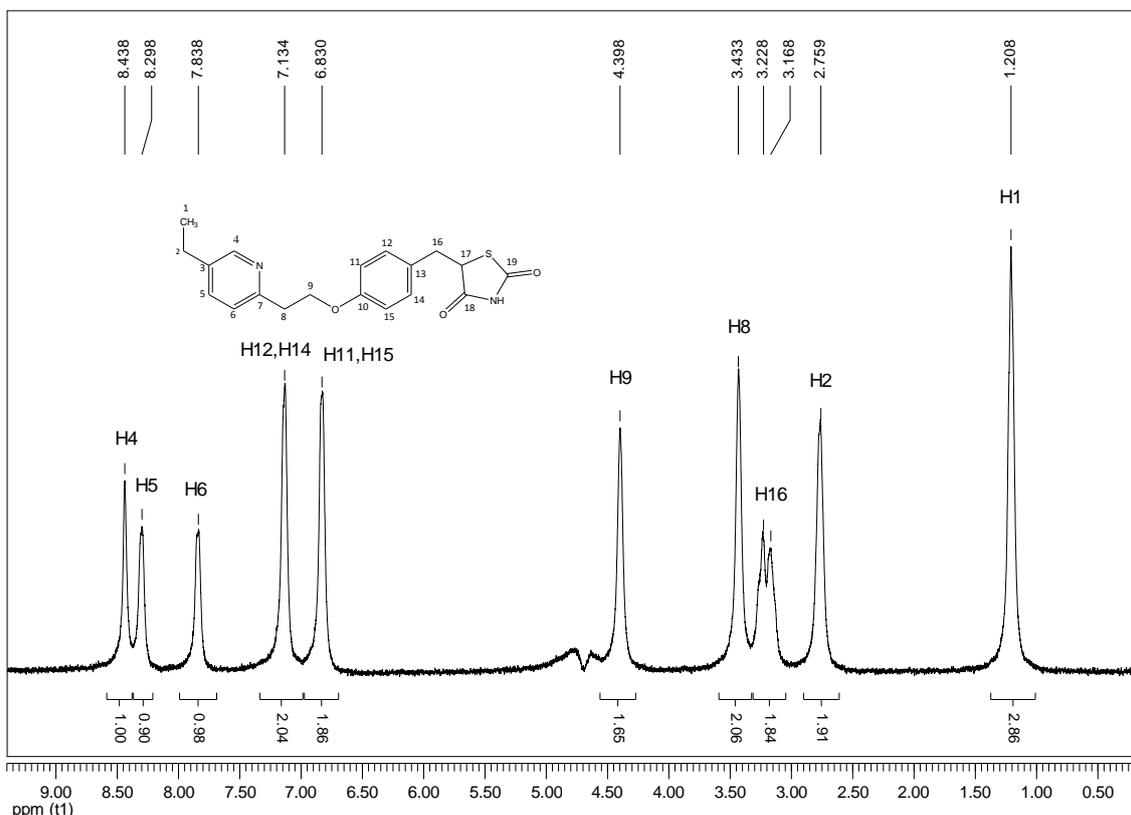
##### 4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para Cloridrato de Pioglitazona

A fim de confirmar a formação do complexo entre a pioglitazona (PIO) e a ciclodextrina, foram realizados também experimentos de RMN para o fármaco puro e seus complexos obtidos pela técnica de *spray drying* (ALI e UPADHYAY, 2008).

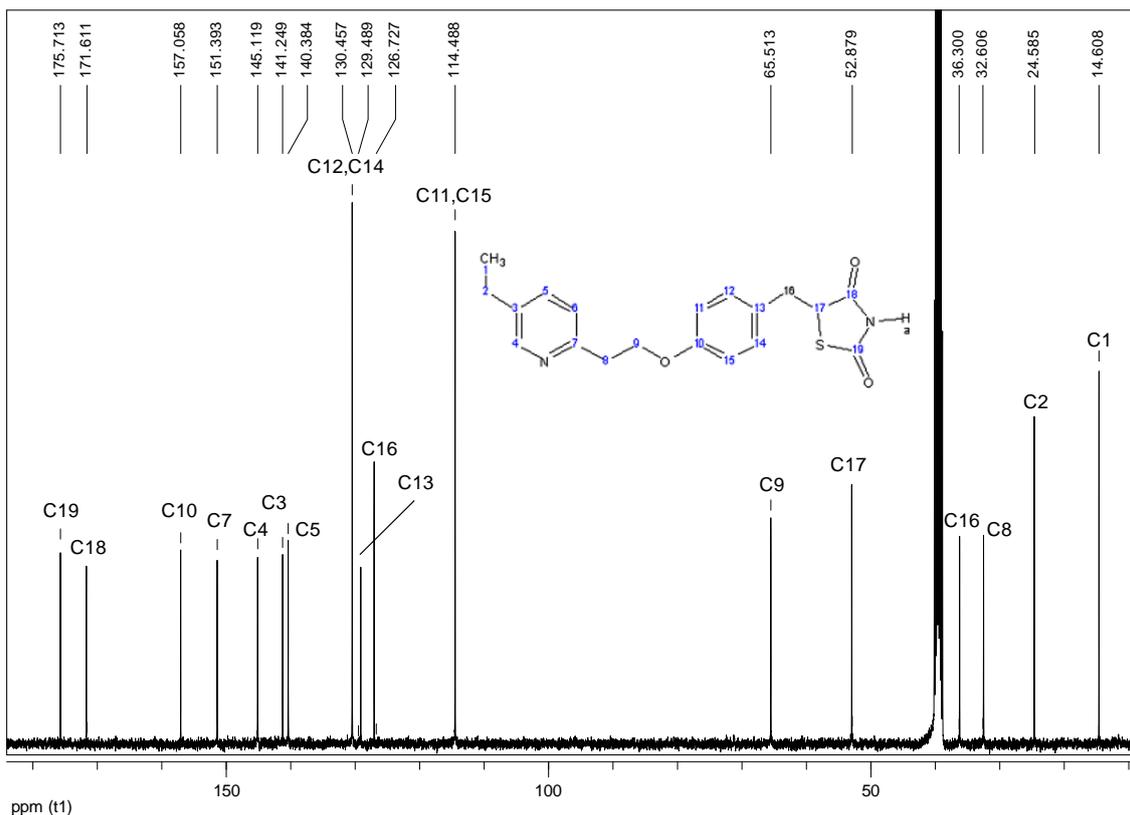
As FIGURAS 30 e 31 apresentam o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da PIO, e as atribuições para os hidrogênios são apresentados na TABELA 6. As atribuições dos sinais de ressonância da PIO foram realizadas com base na análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além da comparação com dados previamente publicados na literatura (ALI *et al.*, 2008). A atribuição dos sinais de ressonância dos hidrogênios teve como ponto de

partida, a atribuição dos hidrogênios H11,H15 ( $\delta$  7,14) e H12,H14 ( $\delta$  6,86) pertencentes ao anel aromático da molécula. Os hidrogênios H4 ( $\delta$  8,44), H5( $\delta$  8,30) e H6( $\delta$  7,84) correspondentes ao anel piridinico. O sinal do hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio não aparece no espectro, uma vez que ocorre a troca espontânea com os átomos de deutério do solvente (ALI *et al.*, 2008; SILVERSTEIN e BASSLER, 2007).

Os sinais de ressonância referentes aos hidrogênios H8 e H9 são observados em  $\delta$  3,43 e  $\delta$  4,40 devido à proximidade ao anel aromático e ao átomo de oxigênio altamente eletronegativo que alteram o ambiente químico e magnético destes núcleos através do efeito indutivo.



**FIGURA 30**– Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHZ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para cloridrato de pioglitazona



**FIGURA 31** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para cloridrato de pioglitazona.

#### 4.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para os compostos de inclusão

As FIGURAS 32 e 33 apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e ROESY para os compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD obtidos pela técnica de *spray drying*.

Analisando os espectros, observa-se que a formação do composto de inclusão leva a pequenas variações de deslocamentos químicos dos  $^1\text{H}$  da PIO em relação ao sistema PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD (FIGURA 32).

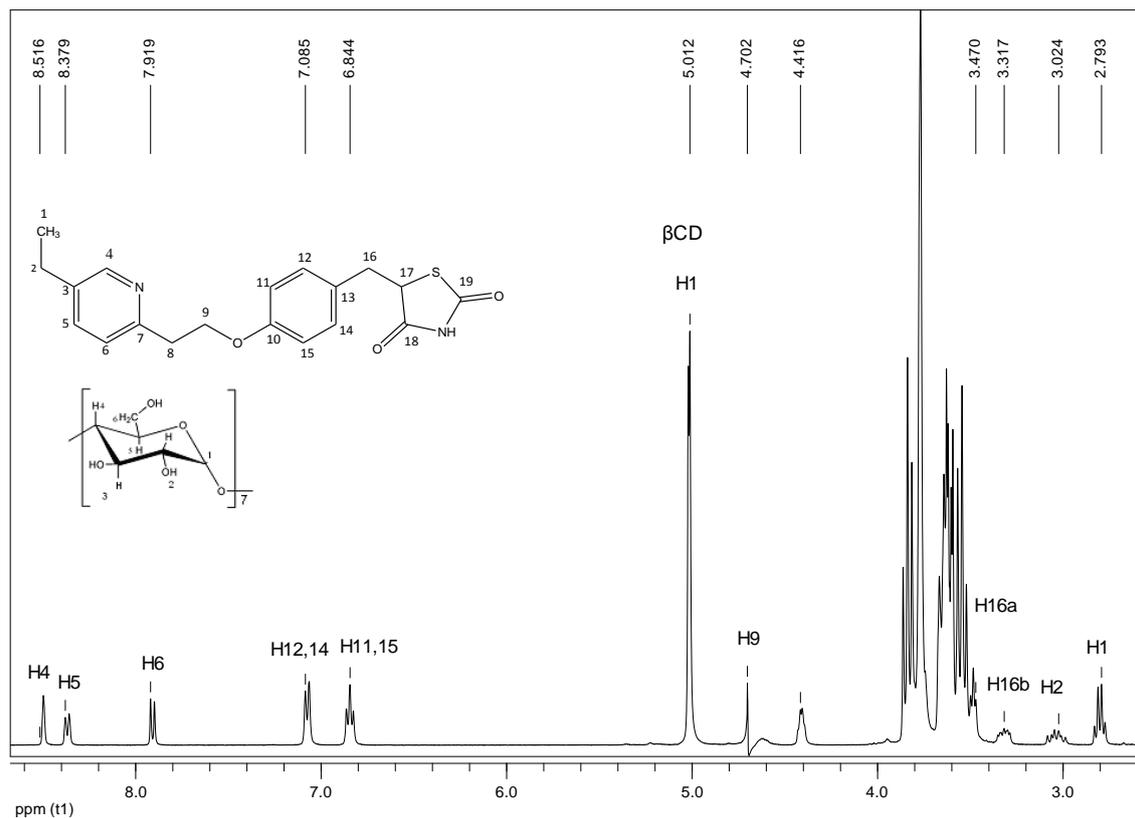
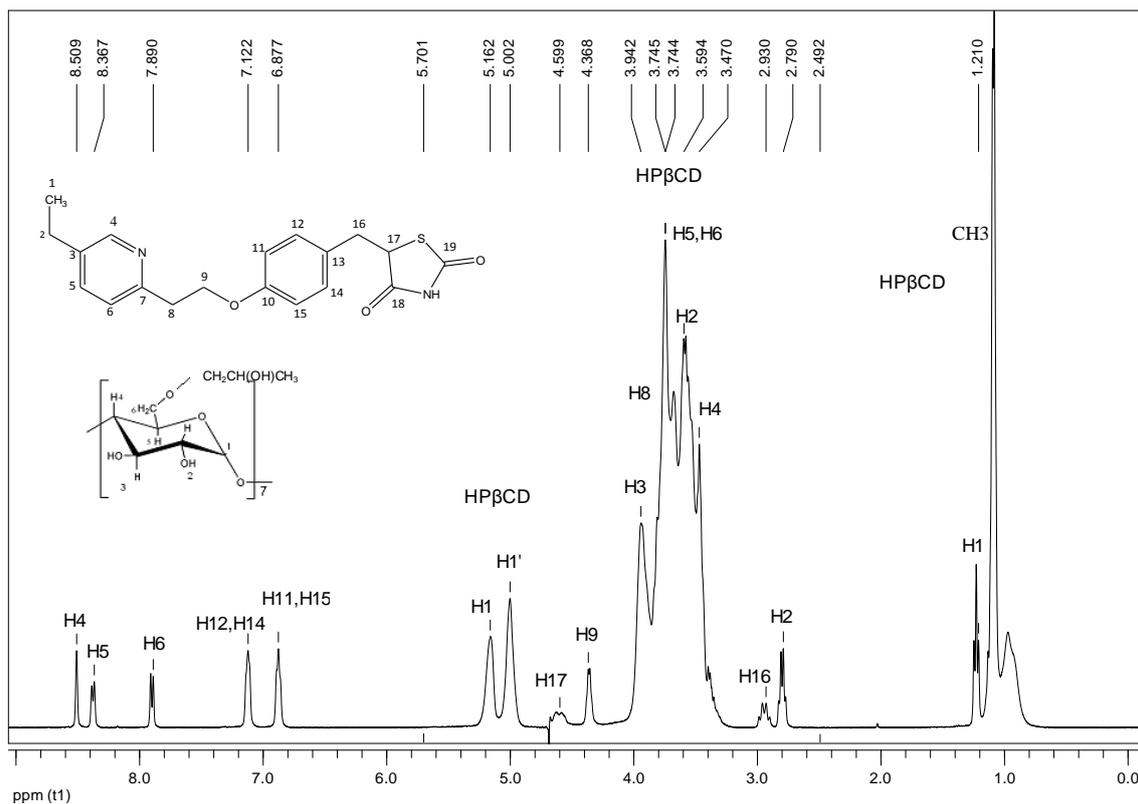


FIGURA 32 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHZ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para o composto PIO: $\beta\text{CD}$ .



**FIGURA 33** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHZ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para o composto PIO:HP $\beta$ CD.

Na TABELA 6 são apresentados os valores de deslocamento químico dados, da PIO e seus compostos de inclusão obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHZ. Observam-se variações nos valores de deslocamentos químicos para os hidrogênios H4, H5 e H6 assim como dos hidrogênios pertencentes ao anel aromático (H11,15 e H12,14), sugerindo uma interação destas regiões da molécula com a cavidade das ciclodextrinas.

**TABELA 5** - Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da PIO e seus respectivos compostos de inclusão em D<sub>2</sub>O a 400MHZ.

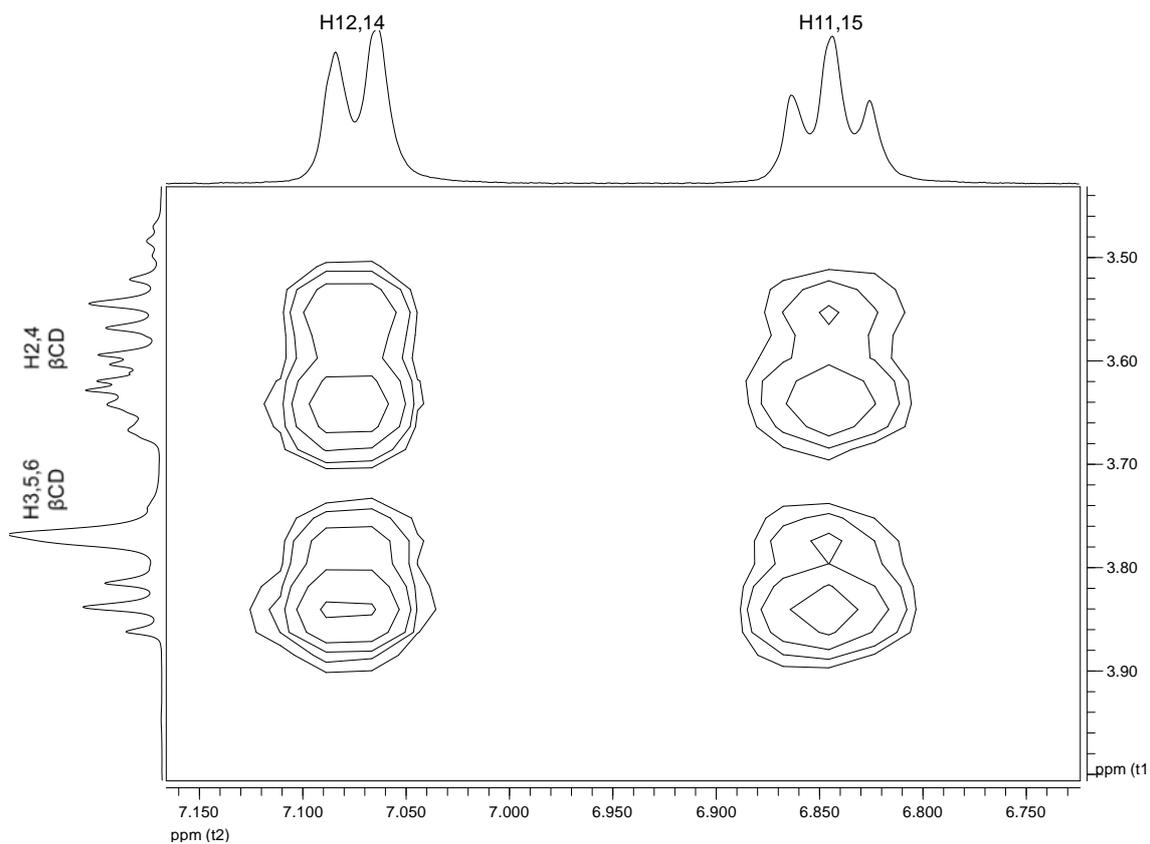
Hidrogênios	PIO ( $\delta$ )	PIO $\beta$ CD ( $\delta$ )	$\Delta(\delta)$	PIO HP $\beta$ CD ( $\delta$ )	$\Delta(\delta)$
H1	1,208	1,210	0,002	1,210	0,002
H2	2,759	2,760	0,001	2,712	0,047
H4	8,438	8,671	0,133	8,674	0,236
H5	8,288	8,255	0,003	8,303	0,015
H6	7,134	7,733	0,587	7,885	0,751
H8	3,433				
H9	4,398	4,366	0,032	4,369	0,029
H11, H15	6,830	6,867	0,037	6,866	0,036
H12, H14	7,134	7,145	0,001	7,145	0,001
H16 a	3,228				
H16 b	3,168				

#### 4.2.2.3 ROESY

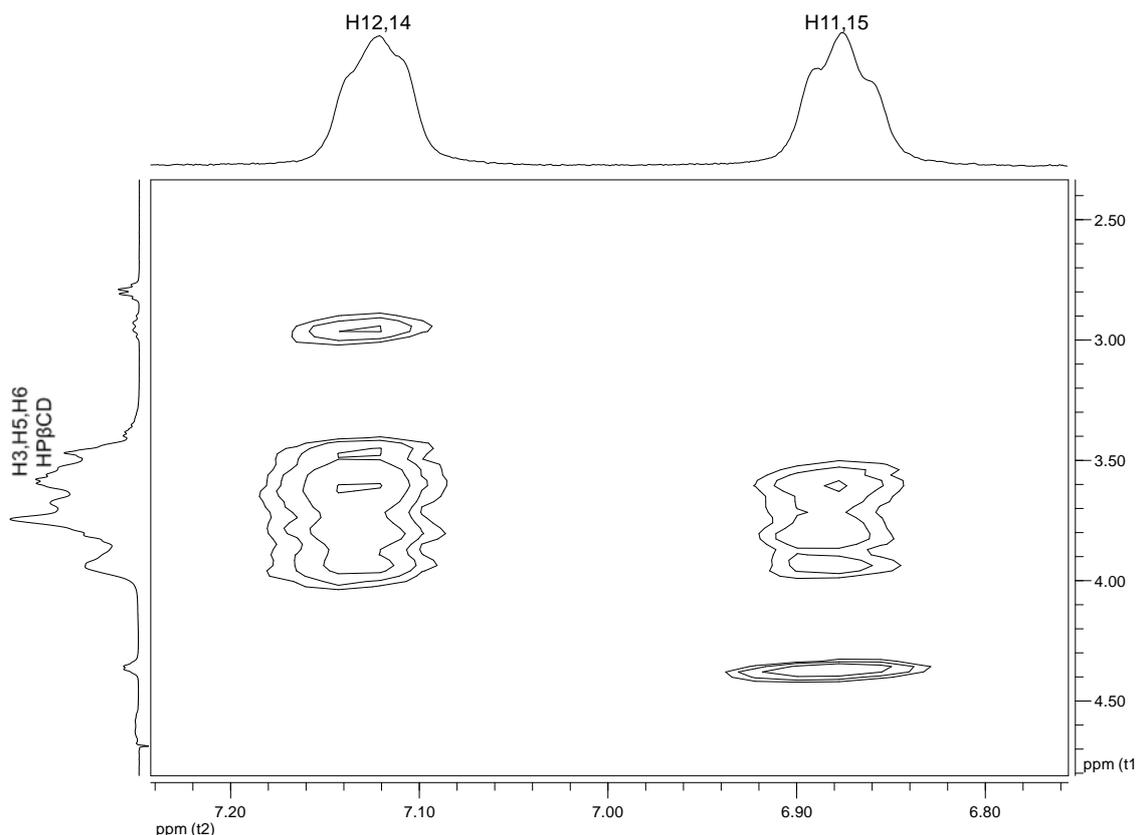
A fim de verificar as possíveis interações entre cloridrato de pioglitazona: $\beta$ -ciclodextrina e cloridrato de pioglitazona:HP $\beta$ -ciclodextrina foram obtidos espectros **ROESY**. A análise dos mapas de contorno obtidos permitiu confirmar a interação entre cloridrato de pioglitazona e as ciclodextrinas.

As FIGURAS 34 e 35 apresentam uma seção expandida dos mapas de contorno **ROESY**, em D<sub>2</sub>O, para os compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD obtidos pela técnica de *spray drying*.

Verificam-se nos mapas de contorno correlações espaciais entre sinais de hidrogênio pertencentes à molécula de cloridrato de pioglitazona e os hidrogênios das diferentes ciclodextrinas ( $\beta$ CD e HP $\beta$ CD). Observam-se correlações fortes, indicativas de acoplamento dipolar entre os hidrogênios H11, H15 e H12, H14 do cloridrato de pioglitazona e os hidrogênios H2, H4 da face externa das ciclodextrinas, indicando uma interação entre as ciclodextrinas e o fármaco. Também são observadas correlações entre os hidrogênios da face interna das ciclodextrinas (H3, H5 e H6) e os hidrogênios do anel benzeno do cloridrato de pioglitazona. Estas correlações confirmam a formação dos compostos de inclusão, pois, somente poderiam ser observadas se o fármaco estivesse incluído na cavidade das moléculas de ciclodextrinas. Em anexo encontram-se os mapas de contorno mostrando todas as correlações dos hidrogênios e podem-se verificar correlações fracas dos hidrogênios H4, H5 e H6 do cloridrato de pioglitazona com os hidrogênios H2, H4, H3, H5 e H6 da  $\beta$ -ciclodextrina.



**FIGURA 34** – Seção expandida do mapa de contornos ROESY para o composto PIO:βCD (400 MHz, D<sub>2</sub>O)



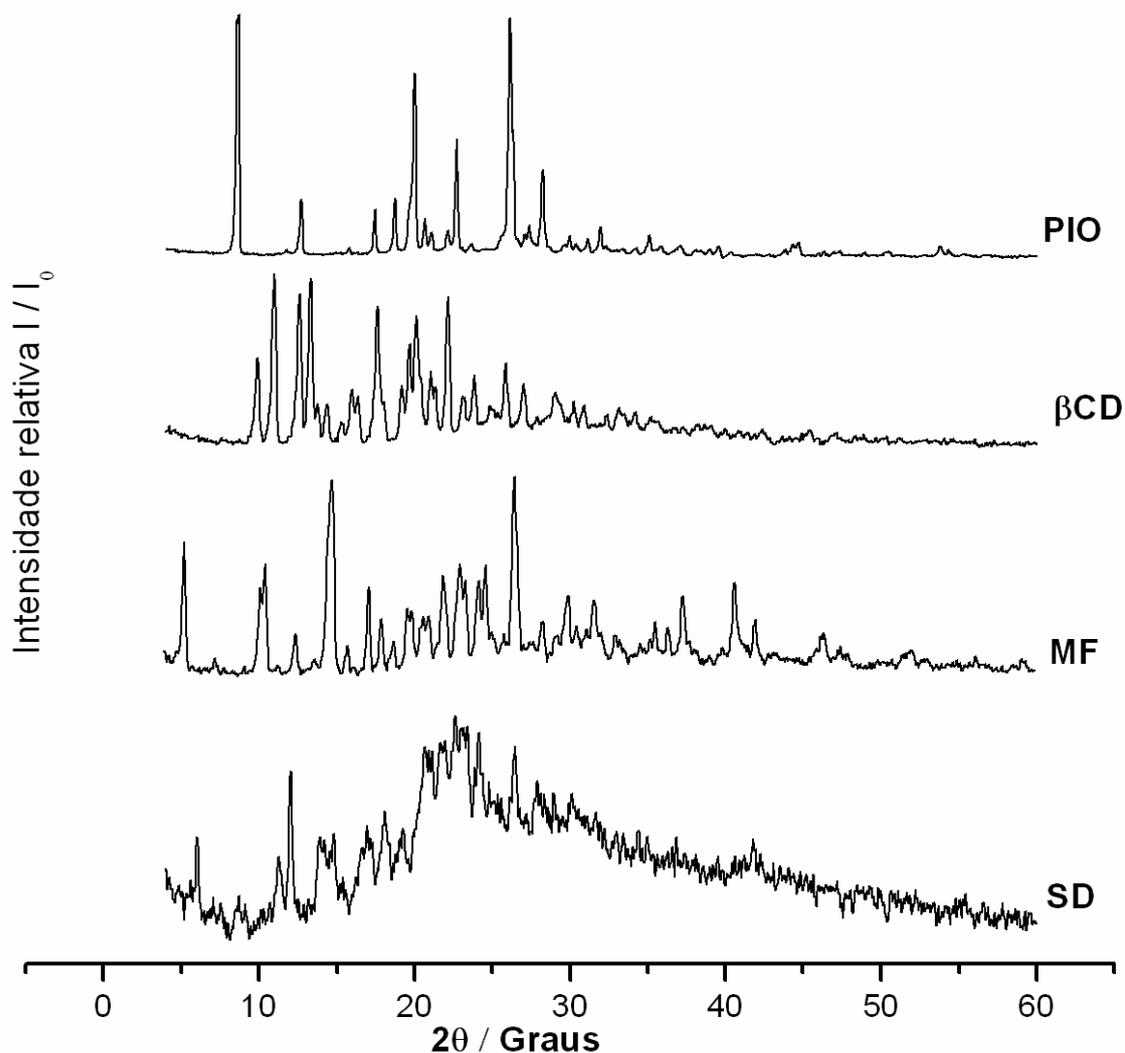
**FIGURA 35** - Seção expandida do mapa de contornos ROESY para o composto PIO:HP $\beta$ CD (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

#### 4.2.3 Difratometria de Raios-X de Pó

Evidências da formação dos compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD também foram observadas nos difratogramas de raios-X de pó apresentados nas FIGURAS 36 e 37, respectivamente, nas quais podem ser verificados os ângulos ( $2\theta$ ) e a intensidade relativa dos picos ( $I/I_0$ ).

Os perfis dos difratogramas de raios-X do cloridrato de pioglitazona e  $\beta$ -ciclodextrina exibem picos distintos, característicos de substâncias poli-cristalinas. Pode-se verificar que o fármaco apresenta-se como um composto cristalino, tendo três picos de maior intensidade em  $2\theta = 8,7^\circ$ ,  $19,8^\circ$  e  $26,5^\circ$ . O perfil de difração da  $\beta$ CD também mostra-se policristalino, tendo os picos característicos mais intensos em  $2\theta = 9,8^\circ$ ,  $23,0^\circ$  e  $27,8^\circ$ . No difratograma da HP $\beta$ CD, não foram observados picos característicos. A substância apresenta característica mais amorfa, com halo de amorficidade centrado em  $2\theta \cong 19^\circ$  (FIGURA 37). Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura (ZENG *et al.*, 2011).

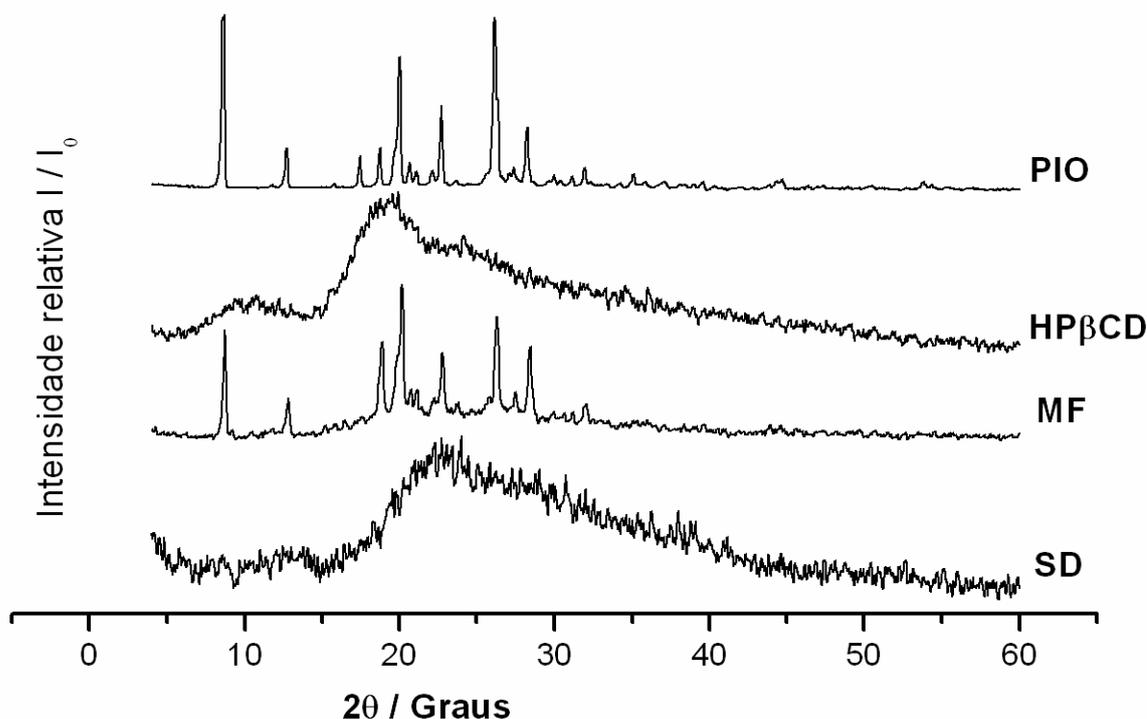
O difratograma da mistura física recentemente preparada de cloridrato de pioglitazona +  $\beta$ -ciclodextrina apresenta-se semelhante ao difratograma do fármaco, sendo ainda claro o pico característico do cloridrato de pioglitazona em aproximadamente  $2\theta = 26,5^\circ$ , sugerindo que não houve interação entre as duas espécies.



**FIGURA 36.** Difratograma de Raios-X de pó para cloridrato de pioglitazona (PIO),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e composto de inclusão obtido pela técnica de *spray drying* (SD).

Entretanto os perfis de difração dos compostos obtidos HP $\beta$ CD e com  $\beta$ CD apresentam diferenças em relação às substâncias puras, mas apresentam semelhanças entre si. Esses compostos não apresentam os picos característicos da PIO em  $2\theta = 9,8^\circ$ ,  $23,0^\circ$  e  $27,8^\circ$ . Observa-se nos difratograma dos compostos PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD que são substâncias com características amorfas. Tal resultado era esperado uma vez que estudos

anteriores demonstraram que o método de secagem para preparação de compostos de inclusão pode induzir processos de amorfização de fármacos (KOHATA, KOUKI e AKIRA, 1993). O processo de amorfização foi especialmente marcante para o composto PIO: HP $\beta$ CD, pois a HP $\beta$ CD já apresentou perfil amorfo antes do processo de inclusão



**FIGURA 37** - Difratograma de Raios-X de pó para cloridrato de pioglitazona (PIO),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e composto de inclusão obtido pela técnica de *spray drying* (SD).

#### 4.2.4 Análise Térmica

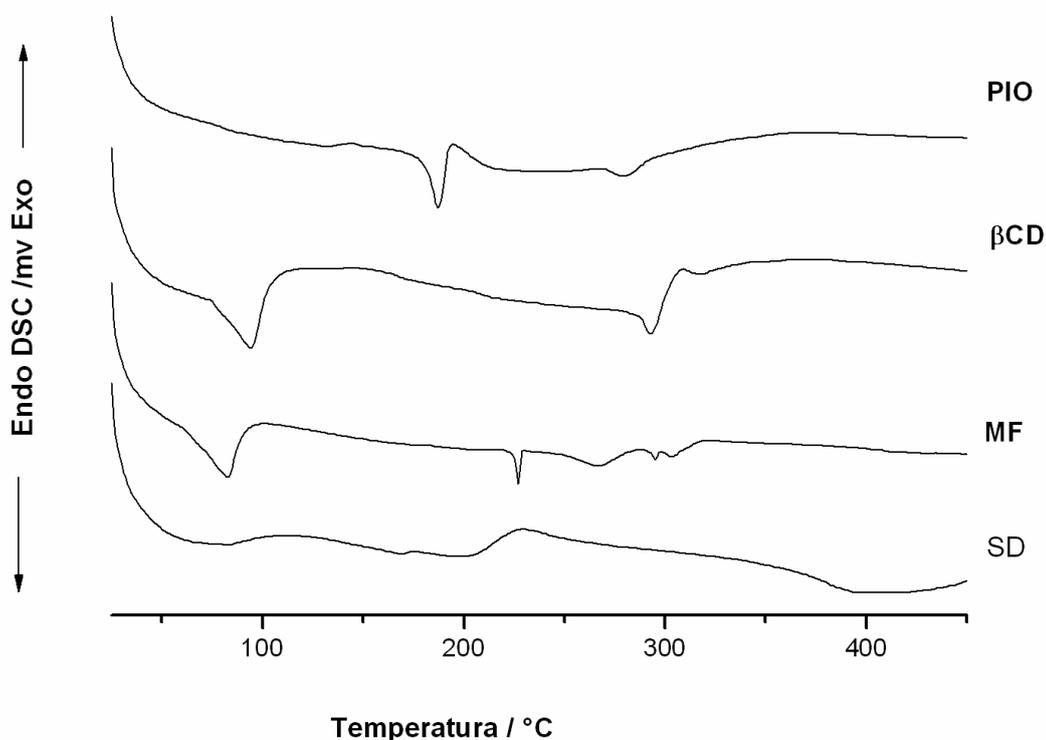
##### 4.2.4.1 Curvas de DSC

As curvas de DSC para PIO,  $\beta$ CD, MF e compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD estão representadas na FIGURA 38 e na FIGURA 39, respectivamente. Em ambos os casos, a curva de DSC para a PIO apresentou um evento em aproximadamente

190°C relacionado ao ponto de fusão do fármaco e um segundo evento, em 283,5°C, associado à termodecomposição da PIO (THE MERCK INDEX, 2006).

Analisando a curva DSC para  $\beta$ CD, pode-se observar um pico endotérmico a 100°C e um segundo em torno de 300°C, eventos que já foram discutidos anteriormente (seção 4.1.4.1, página 50).

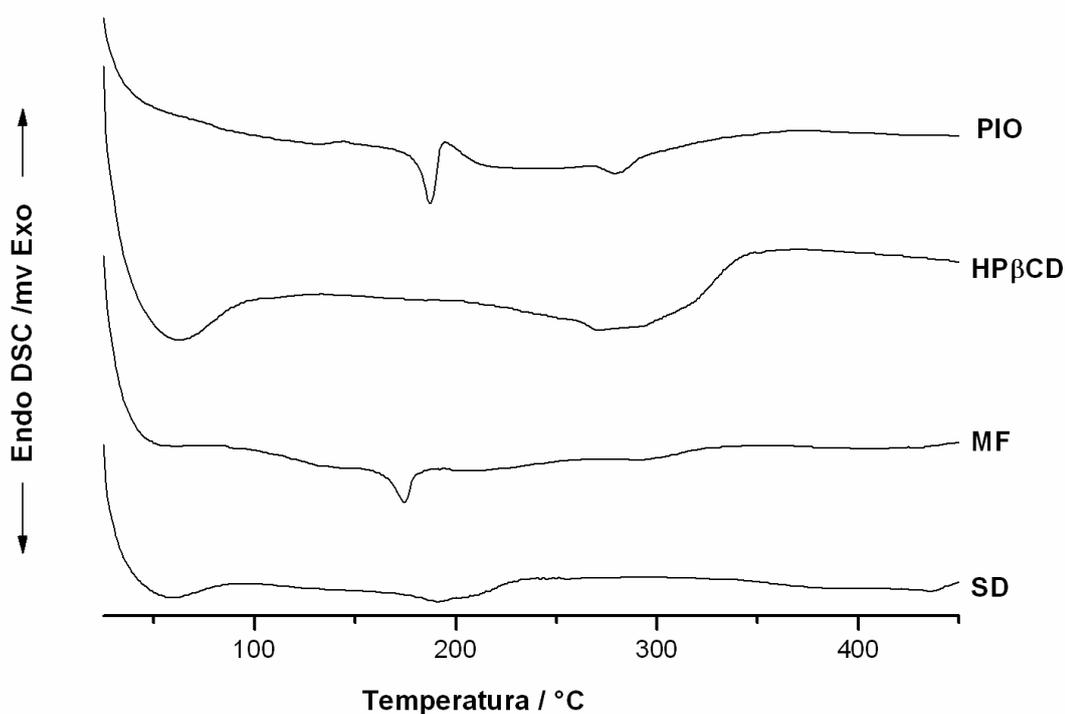
A curva de DSC para MF mostrou um evento relacionado à perda de água da cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina e outro evento relacionado ao ponto de fusão da PIO, porém apresentou-se deslocado para temperaturas mais elevadas em comparação com a curva DSC do fármaco. Essa mudança pode sugerir uma interação provável entre PIO e  $\beta$ CD no estado sólido. A curva DSC para o composto de inclusão SD não mostrou picos endotérmicos em torno de 90°C associados à perda de água da cavidade da ciclodextrina. Ao mesmo tempo, não foi observado o ponto de fusão da PIO em torno 190°C, mas um evento exotérmico a 230°C, provavelmente associado à recristalização (YASUNIWA, 2003). Estes dados sugerem a formação de compostos de inclusão através de interações entre PIO e ciclodextrina.



**FIGURA. 38** - Curvas DSC para PIO,  $\beta$ CD, mistura física (MF) e o composto preparado por *spray drying* (SD)

A FIGURA 39 mostra a curva de DSC para HP $\beta$ CD, onde é observado um evento endotérmico em torno 100°C relacionada à perda de água e outro evento endotérmico em torno de 300°C, associado à termod decomposição da HP $\beta$ CD (GARNERO *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2011). A curva de DSC para MF mostrou um perfil típico de misturas, onde é observado um fenômeno individual da PIO e HP $\beta$ CD, enquanto a curva de DSC para o composto de inclusão SD mostra uma descaracterização das curvas individuais, onde não é possível observar o pico relacionado à fusão da PIO, sugerindo a formação do composto de inclusão através de interações entre PIO e HP $\beta$ CD.

As curvas de DSC dos compostos de inclusão sugerem que a técnica utilizada, *spray drying*, foi adequada, uma vez que as curvas demonstram uma interação hóspede:hospedeiro tanto para o composto PIO: $\beta$ CD quanto para PIO:HP $\beta$ CD.



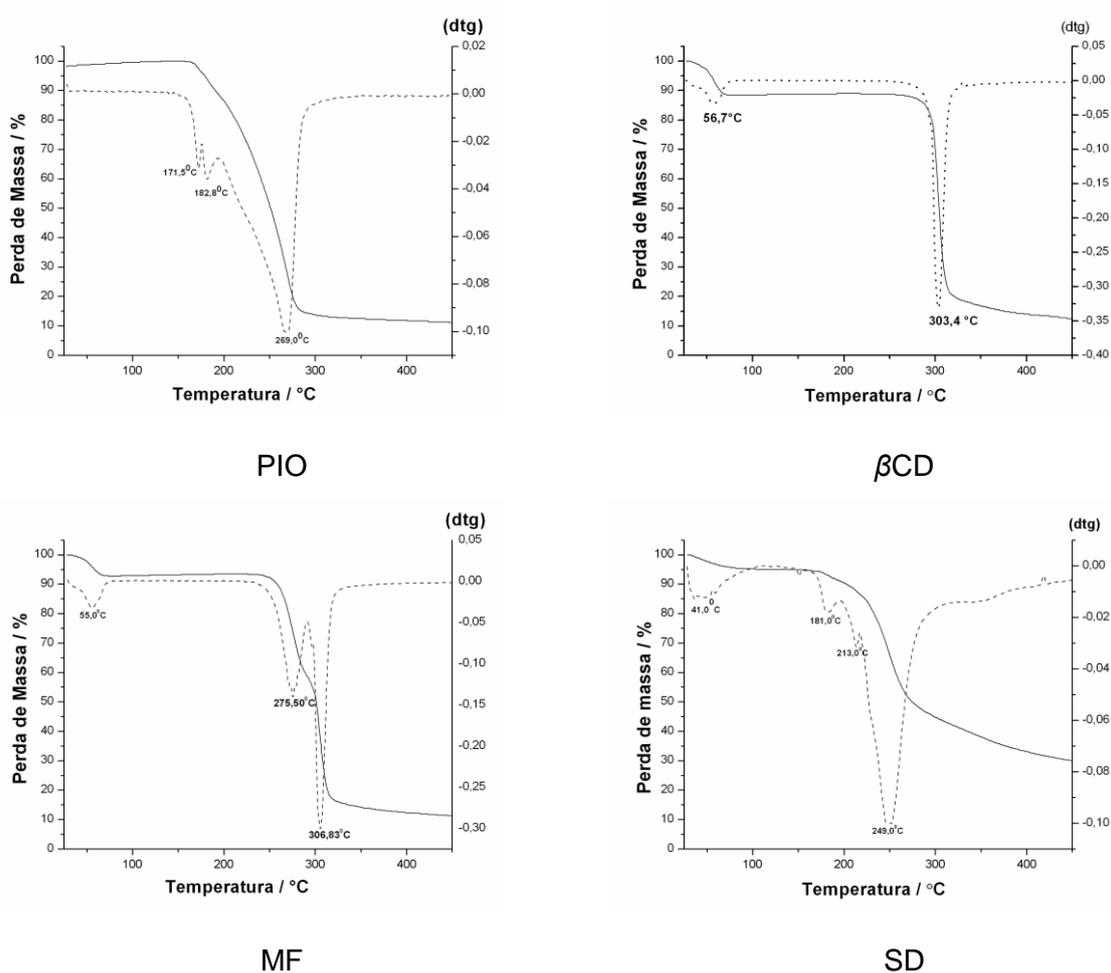
**FIGURA 39** - Curvas DSC para PIO, HP $\beta$ CD, mistura física (MF) e composto de inclusão preparado por *spray drying* (SD)

#### 4.2.4.2 Curvas de TG/DTG

As curvas TG e DTG da PIO,  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD, MF e compostos de inclusão são mostradas nas FIGURAS 40 e 41. Em ambos os casos, PIO apresenta uma decomposição térmica, com eventos em multietapas entre 170°C e 182°C, com perda de 40% em massa e

outro em aproximadamente 269°C, correspondendo uma perda de massa de 90% para o fármaco ao final da análise.

A FIGURA 40 mostra curva de TG e DTG para  $\beta$ CD e apresenta um evento térmico em torno de 100°C correspondente a 15% da perda de massa, e outro na faixa de 300-350°C, correspondente a uma perda de massa de 70%. Ambos os processos estão de acordo com a literatura e poderiam ser associados à perda de água da cavidade ciclodextrina e sua decomposição térmica, respectivamente (KOHATA, 1993; GIORDANO, NOVAK e MAYANO, 2001; ORGOVÁNYI *et al.*, 2005; BETTINETTI, NOVAK e SORRENTI, 2002).



**FIGURA 40** - Curvas de TG/DTG para PIO,  $\beta$ CD, mistura física (MF), e composto obtido por spray drying (SD).

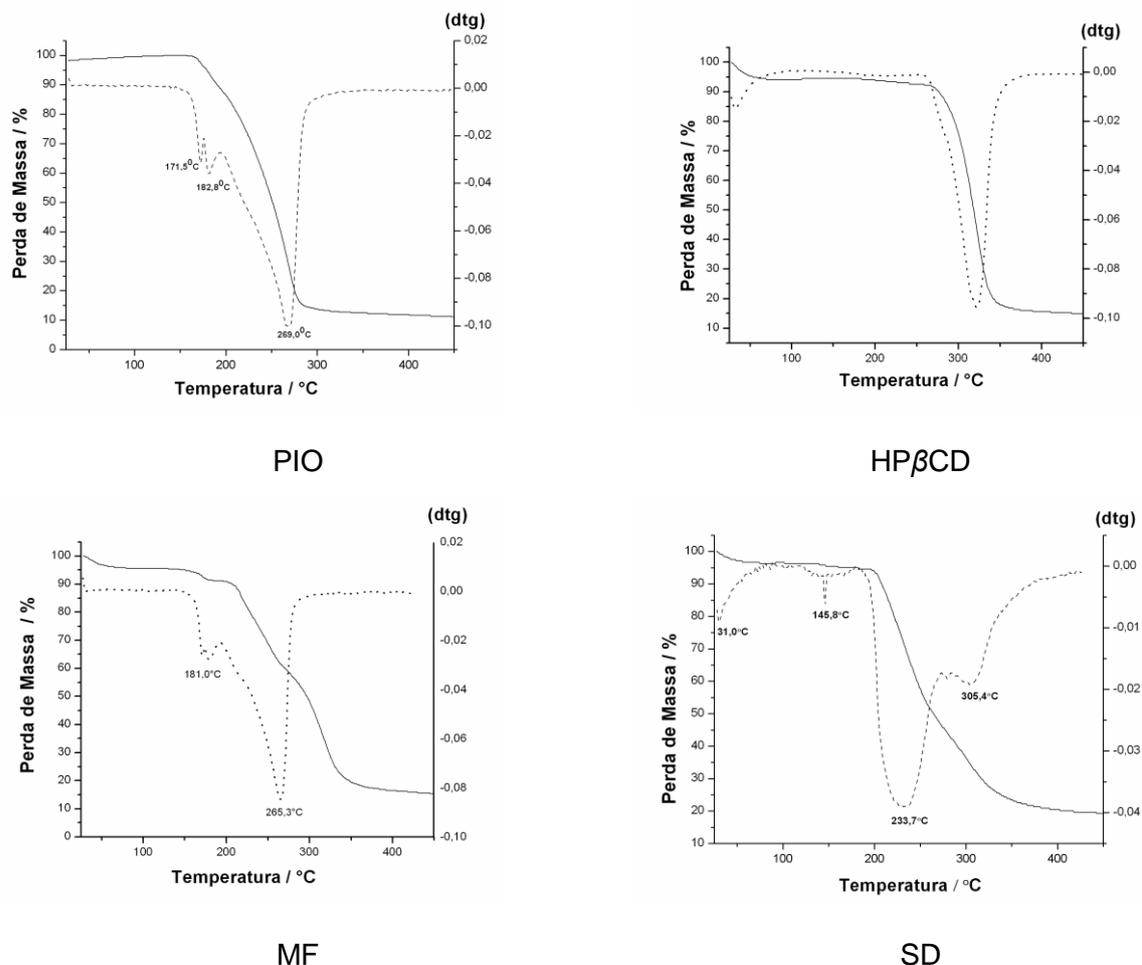
A curva para MF mostra uma perda de massa de 20% em torno de 50°C, podendo ser atribuída à perda de água da cavidade da ciclodextrina, como observado na curva  $\beta$ CD, e a decomposição total da PIO próximo de 322°C.

O composto de inclusão PIO: $\beta$ CD (SD) mostrou um evento térmico a 41°C, correspondendo a 10% de perda de massa relacionado à perda de água, e um segundo entre 180-270°C, correspondendo à termodecomposição da PIO, gerando um resíduo de 20%.

Na FIGURA 41, a curva TG para HP $\beta$ CD mostrou um evento térmico em torno de 100°C com 15% de perda de massa, e um segundo na faixa de 300-350°C, correspondente a 70% da perda de massa. Como descrito para  $\beta$ CD anteriormente, ambos os processos estão de acordo com a literatura e poderiam ser associados à perda de água da cavidade ciclodextrina e decomposição térmica a ciclodextrina, respectivamente (KOHATA, 1993; GIORDANO, NOVAK e MAYANO, 2001; ORGOVÁNYI *et al.*, 2005; BETTINETTI, NOVAK e SORRENTI, 2002). A curva para MF mostrou um perfil muito semelhante à curva de PIO, apresentando eventos térmicos entre 170°C e 182°C e em aproximadamente 269°C relacionados à decomposição térmica.

O composto de inclusão PIO:HP $\beta$ CD mostrou um evento térmico a 55°C, correspondendo a 20% de perda de massa, relacionado à perda de água, e outro entre 200-270°C, sugerindo uma mudança nos eventos térmicos observados anteriormente para as substâncias puras, PIO e HP $\beta$ CD. Essas mudanças sugerem uma interação hóspede-hospedeiro entre o fármaco e a HP $\beta$ CD.

O pico de decomposição principal observado na curva DTG em 233,7°C mostra-se bem alargado, sugerindo que esse composto de inclusão apresenta uma termodecomposição mais lenta e apresenta, conseqüentemente, maior estabilidade térmica.

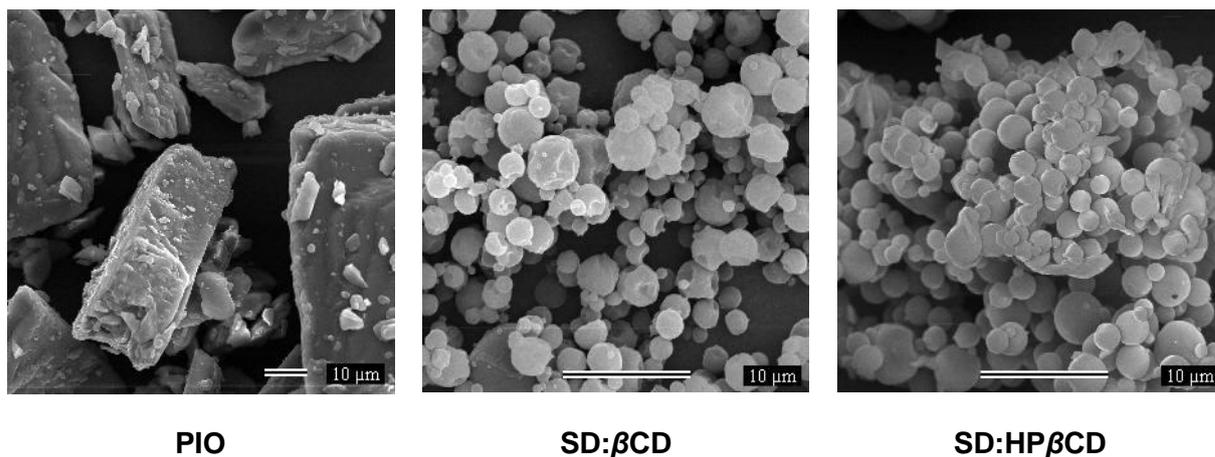


**FIGURA 41** - Curvas de TG/DTG para PIO, HP $\beta$ CD, mistura física (MF), e composto obtido por *spray drying* (SD).

#### 4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A fim de investigar a influência do processo de secagem sobre a morfologia das partículas e também sobre o processo de dissolução, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para PIO, PIO: $\beta$ CD e PIO: HP $\beta$ CD, e os resultados são mostrados na FIGURA 42.

Analisando as fotomicrografias observa-se que PIO apresentou cristais grandes e irregulares, enquanto seus compostos de inclusão PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD mostraram-se como partículas esféricas de tamanho heterogêneo. Esses dados estão de acordo com os resultados de DRX, uma vez que PIO apresentou picos de cristalinidade e os compostos se mostraram como substâncias amorfas.



**FIGURA 42** - Fotomicrografias para cloridrato de pioglitazona e os compostos de inclusão preparados por *spray drying* (SD) com  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD

No entanto, apesar da técnica utilizada para a obtenção dos complexos ter sido a mesma, partículas obtidas para PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD mostraram-se esféricas mas com superfícies e porosidade diferentes. Observa-se que ocorreu uma mudança drástica de forma e aspecto das partículas nas amostras obtidas por *spray-drying*, o que é indicativo da presença de uma nova fase sólida (FERNANDES, VIEIRA e VEIGA, 2002).

Um dos fatores que explicam a porosidade e a forma irregular das microesferas obtidas por *spray drying* foi a velocidade da evaporação do solvente. Como a quantidade de etanol nas soluções PIO: $\beta$ CD e PIO:HP $\beta$ CD era diferente, os tempos de secagem dos produtos também foram diferentes. O composto de inclusão PIO:HP $\beta$ CD continha maior quantidade de etanol que o composto PIO: $\beta$ CD, levando uma secagem mais rápida.

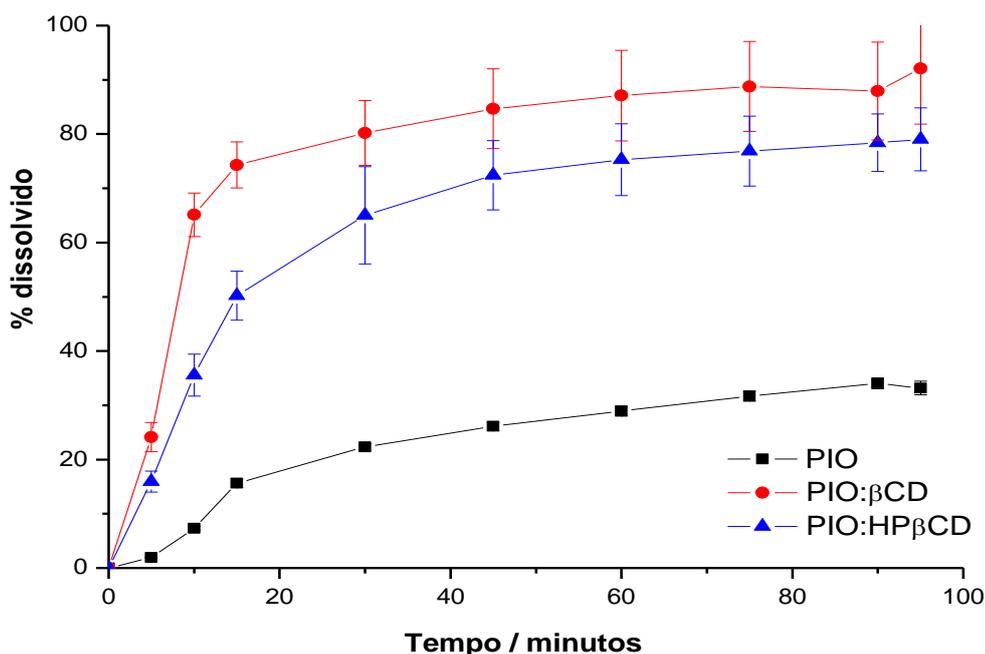
Uma vez que a velocidade de injeção das soluções no equipamento de *spray drying*, quantidade de solvente e o tempo de secagem podem modificar a morfologia das partículas, uma menor velocidade de evaporação do solvente produz partículas com superfície mais lisa, e maiores velocidades, superfícies mais porosas e irregulares (SALÚSTIO *et al.*, 2009; FERNANDES, VIEIRA e VEIGA, 2002). Portanto os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura.

#### 4.2.6 Perfil Dissolução

Estudo de dissolução é um dos testes *in vitro* mais importantes durante o estudo de pré formulação, uma vez que testes *in vitro* fornecem informações sobre o possível comportamento do fármaco *in vivo*, seja na forma livre ou na forma de compostos de

inclusão. Através deste teste podem-se obter informações preliminares sobre a melhoria de biodisponibilidade do fármaco (PIRES, SANTOS e SINISTERRA, 2011; SOUZA et al, 2008).

Os perfis de dissolução da PIO pura e dos dois compostos de inclusão são mostrados na FIGURA 43 e foram realizados em pH 2,0 utilizando-se tampão KCl. Os valores de dissolução foram expressos em porcentagem de fármaco dissolvido.



**FIGURA 43** - Perfil de Dissolução para cloridrato de pioglitazona e os compostos de inclusão preparados por *spray drying* (SD) com  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD realizado em tampão KCl, pH=2,0.

Observa-se que a dissolução do fármaco livre foi limitada ao máximo de 34% em 90 min, o que está de acordo com a baixa solubilidade de PIO em solução aquosa (THE MERCK INDEX, 2006). Por outro lado, a solubilidade do PIO foi significativamente maior após a inclusão em ciclodextrinas. O composto PIO: $\beta$ CD apresentou  $74 \pm 4,0\%$  e  $87 \pm 10\%$  de dissolução em 15 min e 90 min, respectivamente, enquanto o composto, PIO:HP $\beta$ CD apresentou  $47 \pm 4,5\%$  e  $78 \pm 5,2\%$  de dissolução no mesmo tempo citado anteriormente.

Estes resultados sugerem que os compostos de inclusão modificaram a solubilidade da PIO seja com  $\beta$ CD ou HP $\beta$ CD, já que não há diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de dissolução para ambos os compostos de inclusão entre 30 e 90 min.

O composto de inclusão PIO: $\beta$ CD apresentou uma solubilidade superior ao composto PIO:HP $\beta$ CD entre 0 e 30 min.

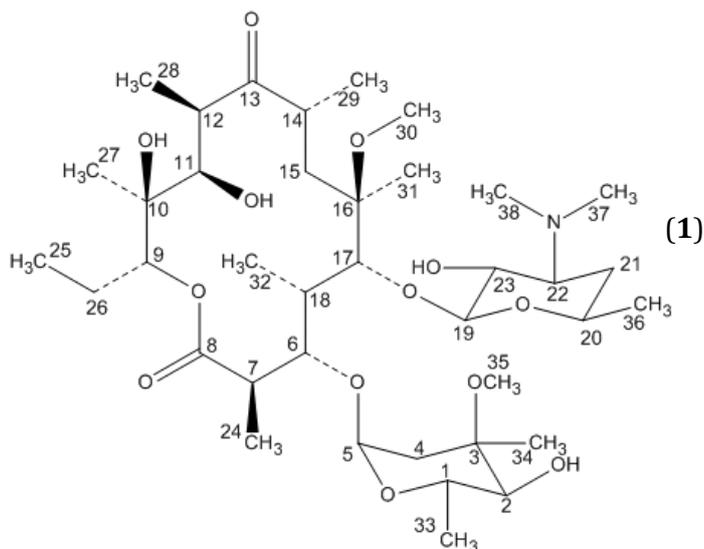
Esse resultado foi surpreendente, uma vez que o esperado era uma maior solubilidade do composto preparado com HP $\beta$ CD, devido à maior solubilidade da HP $\beta$ CD em relação a  $\beta$ CD.

Estes resultados estão de acordo com os dados de DRX, uma vez que a PIO apresentou-se como um pó cristalino e um processo de amorfização foi observado para ambos os compostos de inclusão. Cristalinidade e amorficidade são fatores importantes que estão relacionados com a solubilidade de compostos (PIRES *et al.*, 2011; ZHANGA *et al.*, 2009). Com base nesses resultados, pode-se sugerir que as ciclodextrinas tiveram um papel fundamental no aumento da solubilidade da PIO.

Em relação aos resultados biológicos dos compostos de inclusão obtidos, os estudos ainda encontram-se em andamento.

### 4.3 – Claritromicina, $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de associação

A claritromicina (**1**) foi caracterizada por meio de métodos convencionais de análise, como espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), análise térmica (TG/DTG/DTA e DSC), difração de raios-X de pó e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizando técnicas modernas uni- e bidimensionais.



Para o fármaco claritromicina foram preparadas formulações com  $\beta$ -ciclodextrina e HP $\beta$ -ciclodextrina pelas técnicas de liofilização e *spray drying* nas proporções molares 1:1 e 1:4. A seguir encontram os resultados para os compostos de associação com  $\beta$ -ciclodextrina.

#### 4.3.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.

Elementos comprovativos de complexação entre uma molécula hóspede e CD podem ser obtidos por espectroscopia de infravermelho, porque as bandas responsáveis pela parte da molécula incluída geralmente são deslocadas ou têm alteradas suas intensidades (ZANG *et al.*, 2007). As FIGURAS 44 e 45 representam os espectros de absorção na região do infravermelho para claritromicina,  $\beta$ -ciclodextrina, mistura física e de seus compostos de associação preparados pelas técnicas: liofilização e *spray drying* nas proporções molares 1:1 e 1:4 respectivamente. As atribuições das principais freqüências de vibração para CLA foram feitas com o auxílio da literatura (SILVERSTAIN e BASSLER 2007; IVIC *et al.*, 2007).

No espectro de infravermelho da claritromicina, FIGURAS 44 e 45, observam-se bandas de vibração referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H ( $\nu_{\text{ass}} \text{CH}_3, \text{CH}_2$ ), entre  $2975 \text{ cm}^{-1}$  e aproximadamente  $2782 \text{ cm}^{-1}$ .

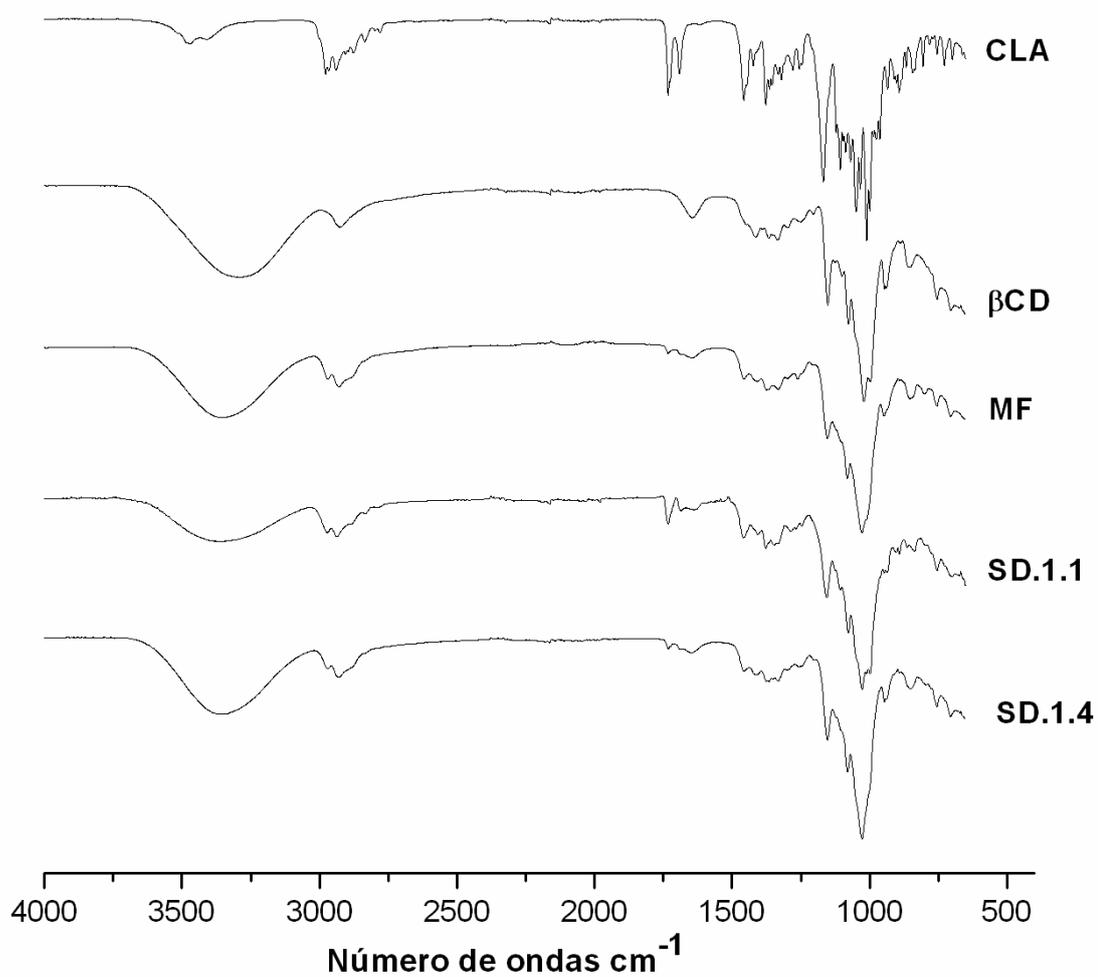
Observam-se ainda bandas entre  $1733 \text{ cm}^{-1}$  e  $1688 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à deformação axial de C=O e bandas em  $1438 \text{ cm}^{-1}$  relacionadas à deformação axial de C-N. Em aproximadamente  $3415 \text{ cm}^{-1}$  observa-se a absorção atribuída à deformação axial de O-H. O espectro mostra ainda bandas de estiramento assimétricos de C-O-C em  $1070 \text{ cm}^{-1}$ . Em torno de  $720 \text{ cm}^{-1}$  são observadas bandas pouco intensas atribuídas à vibração de respiração do anel. Os dados encontrados são semelhantes àqueles descritos em literatura para CLA (ZHANG, ZHANG e ZHONG *et al.*, 2007).

As atribuições mais características da  $\beta$ -ciclodextrina foram discutidas anteriormente (seção 4.1.1, páginas 41 e 42).

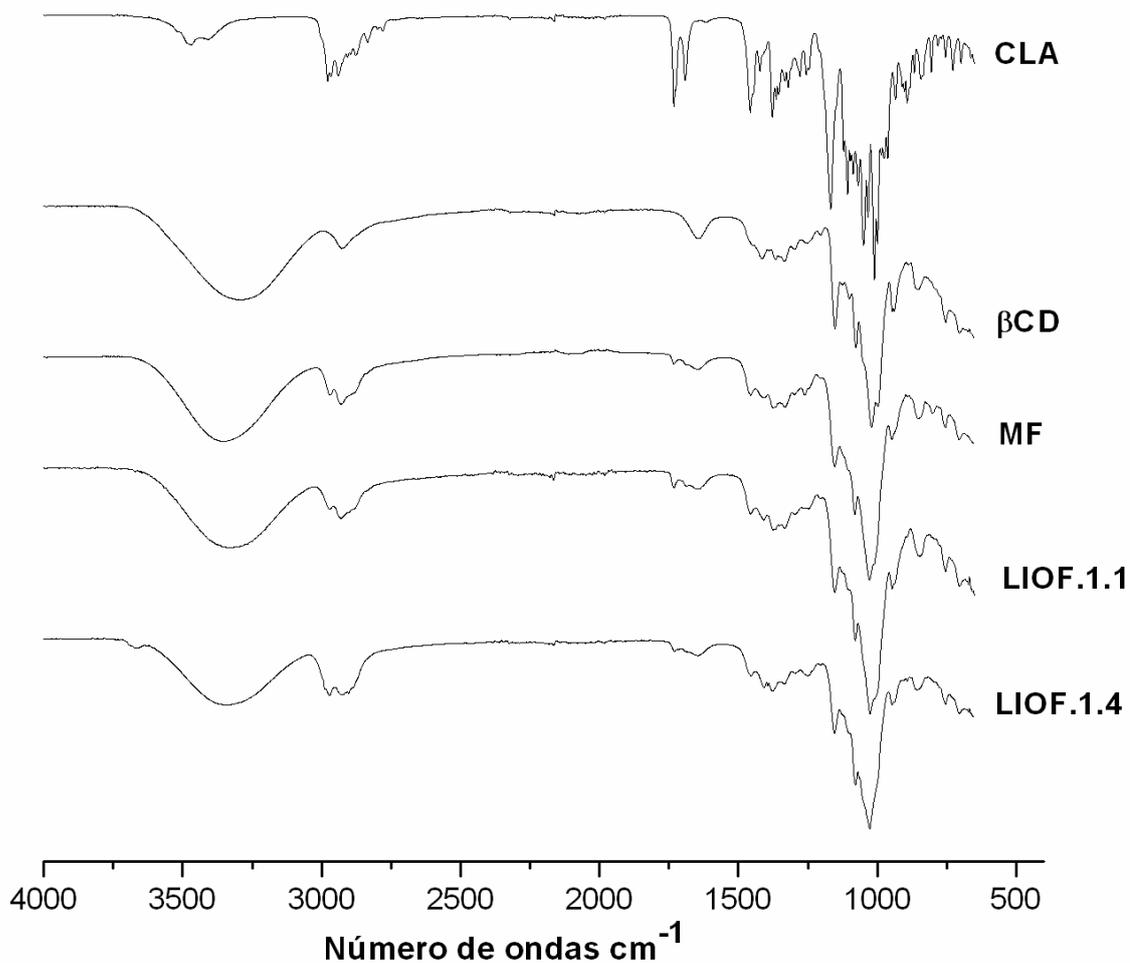
As FIGURAS 44 e 45 apresentam também os espectros de infravermelho para a mistura física. A mesma difere dos componentes individuais, e mesmo apresentando um perfil espectral com alguma semelhança com o dos compostos de associação, não se pode afirmar que há interação do fármaco livre e a  $\beta$ -ciclodextrina no estado sólido.

Pode-se observar nos espectros obtidos para todos os compostos de associação que os mesmos são muito semelhantes entre si e que ocorreram alterações de algumas bandas características da claritromicina.

Os espectros referentes aos compostos de associação não mostraram o desaparecimento das bandas em  $1688, 1438$  e  $3415 \text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas a grupos C=O e  $\text{CH}_3$ , e a deformação axial de O-H, o que sugere a interação desta parte do fármaco com a  $\beta$ CD. Podem ser observados também deslocamentos das bandas em  $2985, 1445, 1160$  e  $1113 \text{ cm}^{-1}$ . Nesta região ainda observa-se uma banda em  $1730 \text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído a um sinal do fármaco ou a uma superposição das bandas do composto de associação. Em torno de  $1050 \text{ cm}^{-1}$  são vistos os estiramentos O-H e C-O-C, e verifica-se que ocorre uma modificação dos modos de vibração nesta região, o que sugere uma possível interação da claritromicina com a  $\beta$ -ciclodextrina.



**FIGURA 44** - Espectros de absorção na região do infravermelho para claritromicina (CLA),  $\beta$  – ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e compostos de associação obtido pela técnica *spray drying* (SD), nas proporções 1:1 e 1:4.

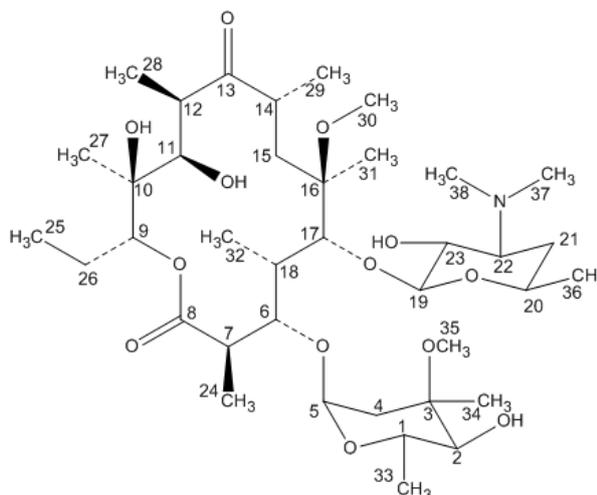


**FIGURA 45** - Espectros de absorção na região do infravermelho para claritromicina (CLA),  $\beta$  – ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF) e composto de associação obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções 1:1 e 1:4.

#### 4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear para complexos formados entre Claritromicina e $\beta$ -ciclodextrina

##### 4.3.2.1. Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) para Claritromicina

A análise da claritromicina (FIGURA 46) por ressonância magnética nuclear serve de base para comprovar a pureza do material utilizado no preparo das formulações farmacêuticas com  $\beta$ -ciclodextrina através dos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio da molécula.



**FIGURA 46** – Estrutura da Claritromicina

Em função da complexidade estrutural da molécula de Claritromicina, a atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foi feita com base na análise conjunta de espectros uni- (RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135) e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC e NOESY). Os valores de deslocamentos químicos assim como as atribuições dos sinais são apresentados na TABELA 6.

O método utilizado para a atribuição dos sinais de ressonância de compostos que possuem estruturas um pouco mais complexas, onde ocorre grande sobreposição de sinais de RMN, é chamado de método de encadeamento. Partindo-se de um sinal com o deslocamento químico estabelecido, faz-se a conexão com os outros sinais de ressonância pertencentes aos hidrogênios e carbonos da molécula por intermédio da análise dos espectros uni- e bidimensionais obtidos para o composto sob estudo.

Todos os sinais de hidrogênio e carbono da molécula apresentaram valores de deslocamentos químicos condizentes com a estrutura química do fármaco.

A FIGURA 47, a seguir, apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a claritromicina, obtido em  $\text{DMSO}-d_6$ , uma vez que o fármaco livre não apresenta solubilidade suficiente em  $\text{D}_2\text{O}$  para a obtenção de espectros.

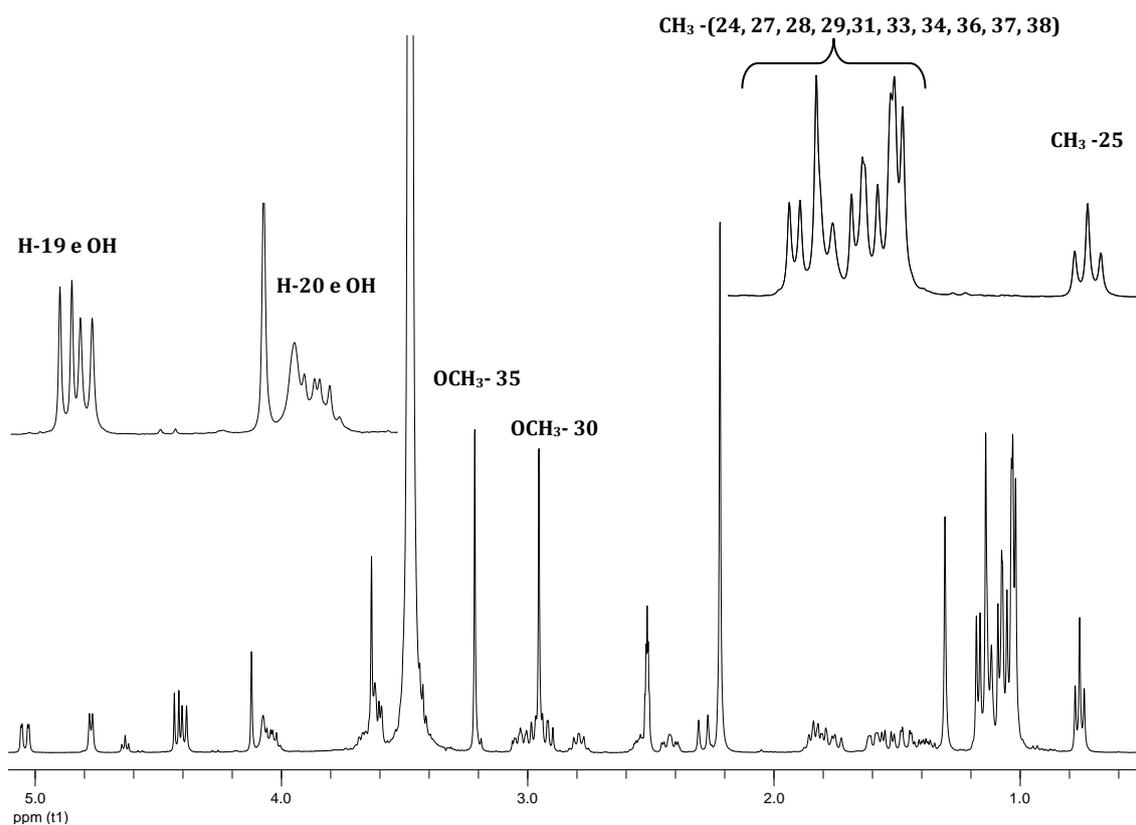


FIGURA 47 - RMN de  $^1\text{H}$  para a Claritromicina, 400 MHz (DMSO- $d_6$ ).

TABELA 6 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  para a Claritromicina em DMSO- $d_6$ , 400 MHz.

Hidrogênios	$\delta$ (ppm)	Hidrogênios	$\delta$ (ppm)
1	3,0254	25	0,752
2	2,9166	26a	1,7207
4a	2,3008	26b	1,3591
4b	1,4534	27	1,1335
5	4,7714	28	1,06
6	3,6005	29	1,07
7	2,5372	30	2,9502
9	5,0399	31	1,2992
11	3,6652	32	1,03
12	2,9811	33	1,12
14	2,8083	34	1,04
15a	1,7576	35	3,2110
15b	1,4790	36	1,63
17	3,6172	37	2,2114
18	1,7838	38	2,2114
19	4,4076	OH	4,11
20	4,0327	OH	4,40
21a	1,3945	OH	4,63
21b	1,06860		
22	2,4196		
23	3,6005		
24	1,08		

#### 4.3.2.2. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ para os complexos claritromicina/ $\beta$ -ciclodextrina

O uso do RMN tem contribuído significativamente no estudo de ciclodextrinas e seus compostos de associação, fornecendo informações sobre interações e modos de ligação nas associações e complexações, além de disposições espaciais de grupos funcionais destas moléculas e/ou complexos (SCHNEIDER, *et al.*, 1998; LOFTSON, *et al.*, 1993).

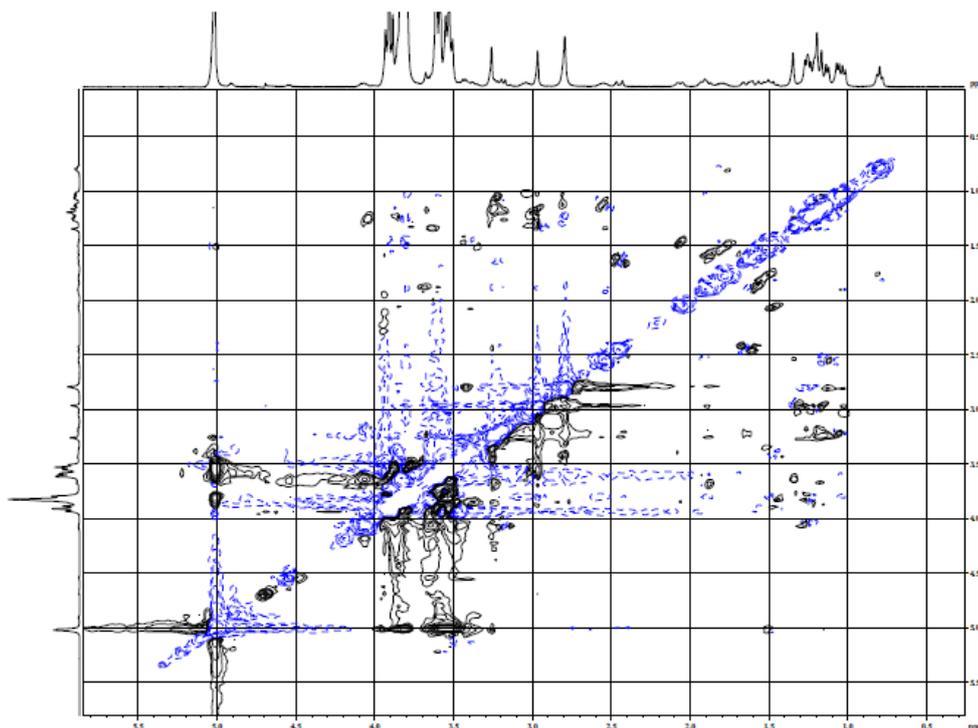
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os complexos preparados nas proporções estequiométricas 1:1 e 1:4 foram obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$  de modo a evitar a interferência do solvente na topologia do complexo, visto que em alguns casos observa-se a quebra do sistema supramolecular, em função da presença de  $\text{DMSO-}d_6$  no meio, visto que este solvente apresenta grande afinidade pela cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina.

Os espectros foram analisados e seus dados foram comparados com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do fármaco livre obtidos anteriormente. Não foram observadas grandes alterações nos deslocamentos químicos dos sinais de ressonância dos hidrogênios, indicando que os métodos utilizados na preparação dos complexos não provocam mudanças estruturais na molécula de Claritromicina.

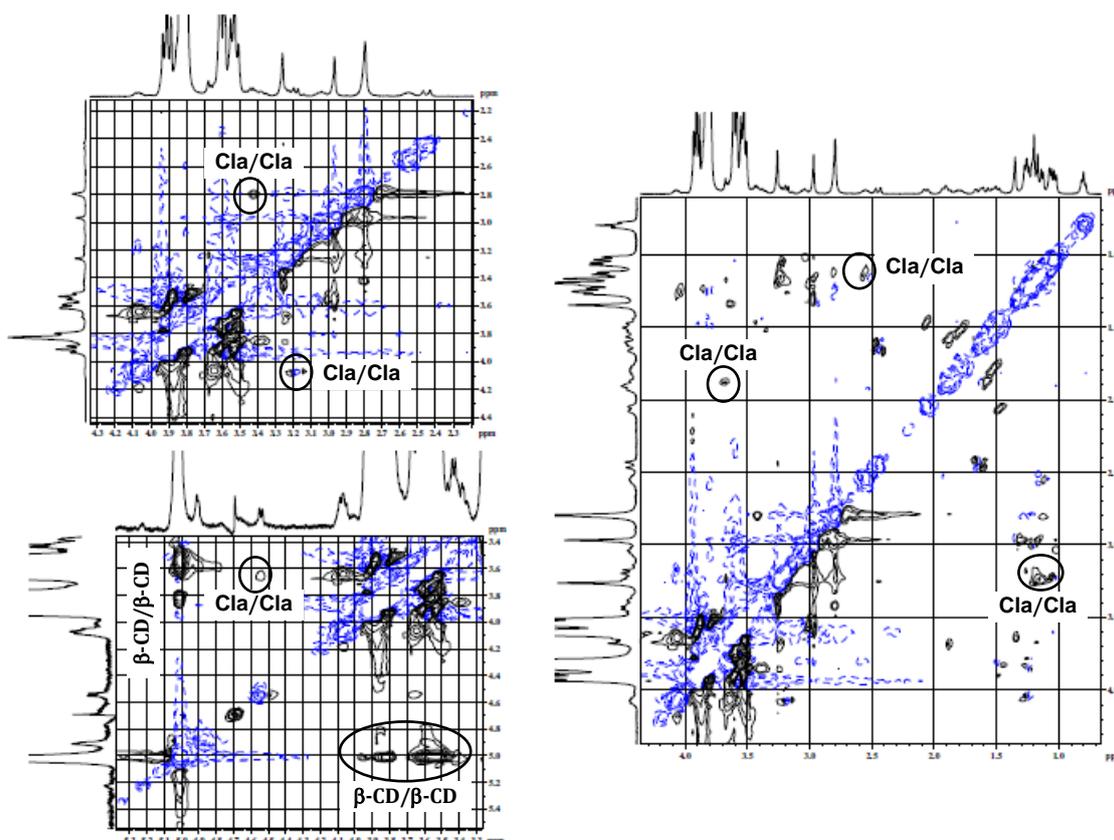
#### 4.3.2.3. ROESY e DOSY

A comprovação da formação dos complexos entre claritromicina e a  $\beta$ -ciclodextrina foi feita através da análise dos mapas de contorno ROESY e dos espectros de difusão obtidos através do experimento de *Difusion Ordered Spectroscopy* (DOSY).

Na FIGURA 48 é apresentado o mapa de contornos ROESY para a preparação farmacêutica entre claritromicina e  $\beta$ -ciclodextrina (CLARIDGE, 1999). Devido à grande sobreposição de sinais, a análise do mapa de contornos ROESY não permitiu identificar correlações indicativas de acoplamento dipolar entre as moléculas de claritromicina e  $\beta$ -ciclodextrina que possam confirmar a formação de composto de associação ou de complexo de associação. Na FIGURA 49 são apresentadas algumas seções expandidas do mapa de contornos ROESY que confirmam a grande sobreposição de sinais.



**FIGURA 48** Mapa de contornos de ROESY para o sistema claritromicina/ $\beta$ -CD (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).



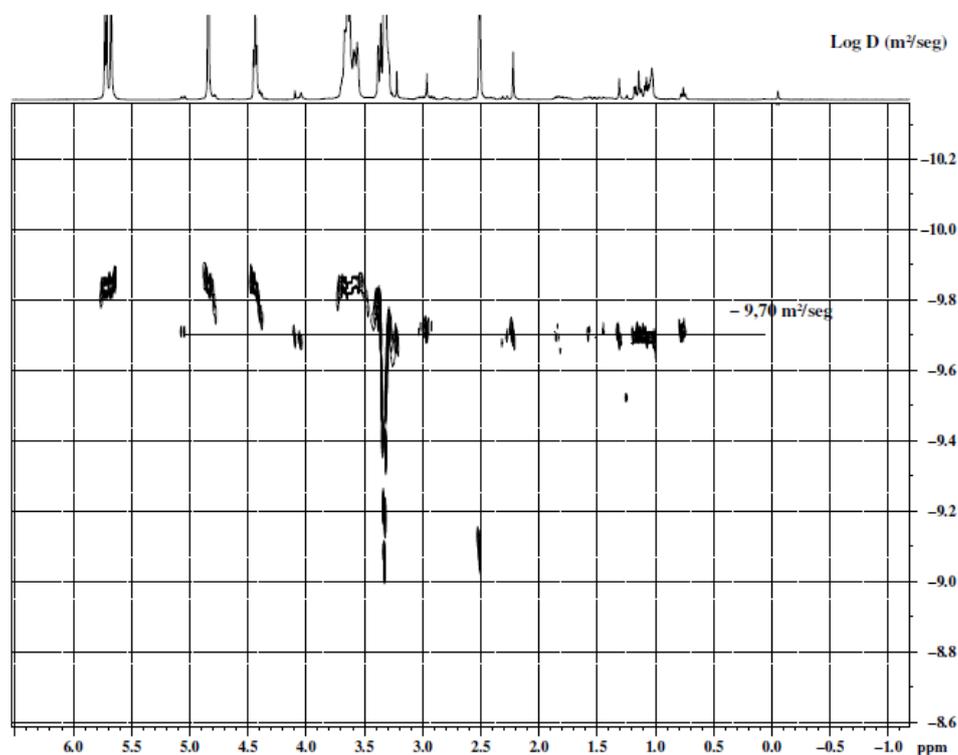
**FIGURA 49-** Seções expandidas do mapa de contornos de ROESY para o sistema claritromicina/ $\beta$ -CD (400 MHz, DMSO- $d_6$ ). Em destaque são mostradas correlações indicativas de acoplamento dipolar em regiões de sobreposição de sinais.

Com o intuito de confirmar a interação entre a  $\beta$ -ciclodextrina e a molécula hóspede, os complexos liofilizados foram avaliados por meio de experimentos HR-DOSY, que é uma metodologia conveniente para a caracterização de complexos supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro.

Os experimentos de DOSY possibilitam separar os sinais de ressonância de diferentes espécies de acordo com os seus coeficientes de difusão e, se estas espécies apresentam o mesmo coeficiente de difusão é uma indicação de que as mesmas estão conectadas por meio de fortes ligações de hidrogênio e permanecem juntas tempo suficiente para serem detectadas como um único sistema molecular (JOHNSON *et al.*, 1999; FERNANDES, 2005; CABALEIRO-LAGO *et al.*, 2006).

Na FIGURA 50 é apresentado o mapa de DOSY para o complexo obtido na proporção molar 1:4.

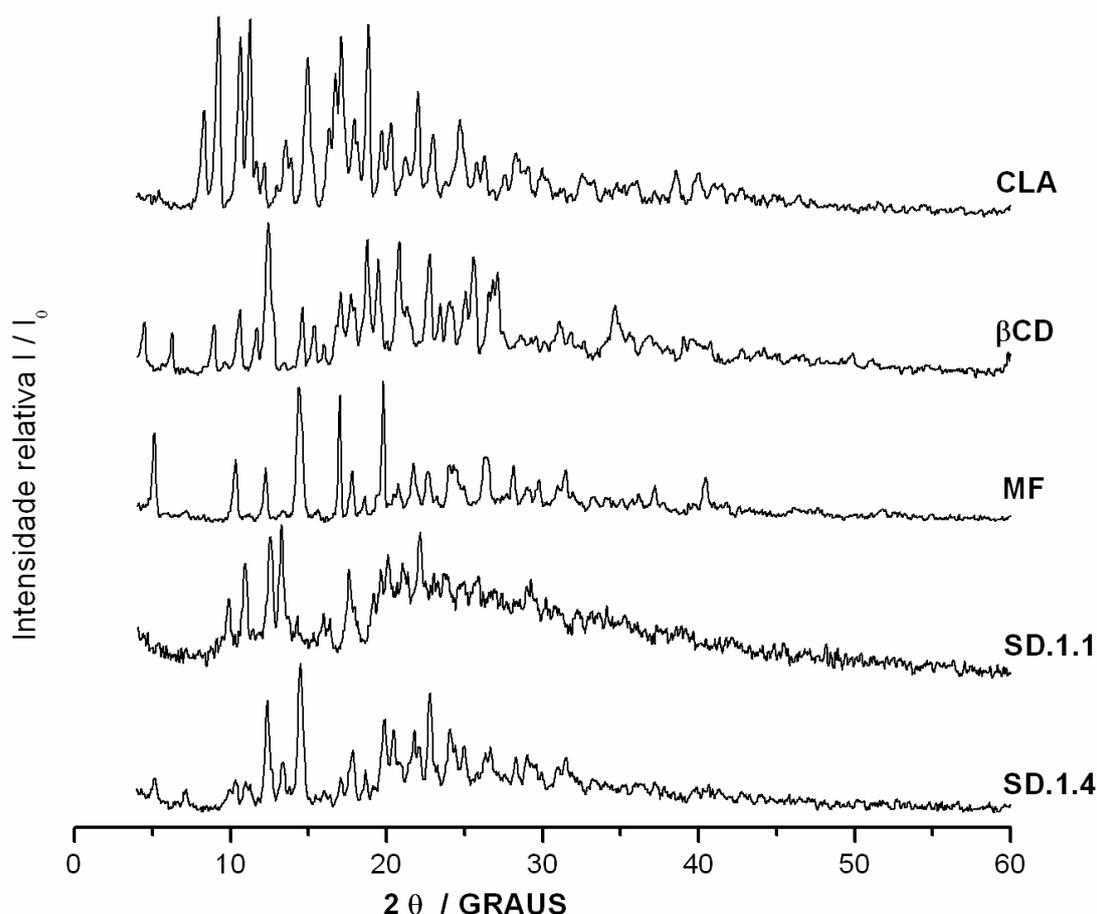
No experimento de DOSY quando há interação entre duas ou mais substâncias são observadas manchas de correlação para todos os átomos de hidrogênio dos compostos, para um mesmo valor de coeficiente de difusão ( $D$ ). Para os sistemas CLA: $\beta$ CD é observado que o coeficiente de difusão apresenta um único ( $\text{Log } D = 9,70 \text{ m}^2/\text{seg}$ ), indicando que as moléculas de claritromicina e  $\beta$ -ciclodextrina se comportam como uma única unidade molecular em solução, complementando a análise por RMN e comprovando a existência do complexo supramolecular.



**FIGURA 50** - Espectros de HR- DOSY para o complexo CLA:βCD (1:4) a 400 MHz, D<sub>2</sub>O.

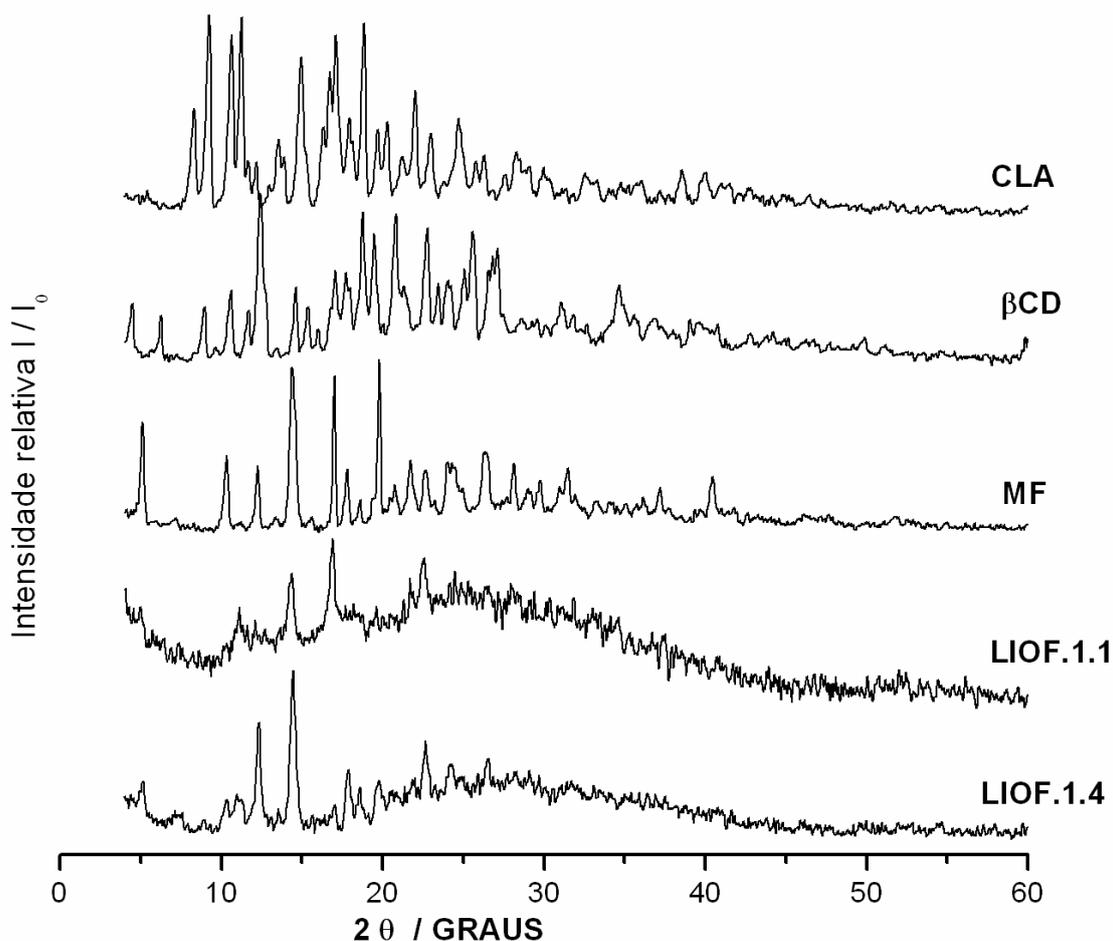
#### 4.3.3. Difractometria de Raios-X de Pó

Os difratogramas de Raios-X pó para claritromicina, β-ciclodextrina e seus compostos de associação em diferentes proporções molares preparados pelos métodos *spray drying* e liofilização são apresentados nas FIGURAS 51 e 52, nas quais podem ser verificados os ângulos ( $2\theta$ ) e a intensidade relativa das bandas ( $I/I_0$ ).



**FIGURA 51** - Difratoograma de Raios-X de pó para claritromicina (CLA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e os compostos de associação obtidos pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4.

Analisando o difratograma de raios-X da claritromicina, pode-se verificar que o fármaco apresenta características de composto policristalino, com os bandas de maior intensidade compreendidos em  $2\theta = 9,3^\circ$  a  $18,9^\circ$ . O perfil de difração da  $\beta$ -ciclodextrina apresenta-a como uma substância cristalina podendo ser verificado nas FIGURAS 51 e 52 que as linhas características mais intensas da  $\beta$ -ciclodextrina estão compreendidas em  $2\theta = 12,4^\circ$  a  $20,8^\circ$ . O difratograma para a mistura física recentemente preparada apresenta-a como substancia cristalina, porém com deslocamento dos bandas característicos das substâncias puras.



**FIGURA 52** - Difratoograma de Raios-X de pó para claritromicina (CLA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), mistura física (MF), e os compostos de associação obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4.

Analisando os difratogramas de raios-X para os compostos de associação, verifica-se que o composto SD 1:4 apresenta-se como substância semicristalina, apresentando deslocamentos referentes aos bandas mais característicos do fármaco em  $2\theta = 10^\circ$  a  $15^\circ$ , enquanto o composto de associação obtido na proporção molar 1:1 não mostra deslocamento destes bandas característicos, sugerindo uma menor interação do fármaco com a  $\beta$ CD nesta proporção molar, além de apresentar sinais de amorfização para o composto.

Em relação aos compostos de associação (LIOF 1:1 e 1:4), os perfis de difração apresentam diferenças em relação às substâncias puras. Apesar da técnica utilizada na obtenção dos compostos de associação obtidos nas proporções molares 1:1 e 1:4 ser a mesma, os mesmos apresentam difratograma ligeiramente diferentes, o que pode ser

explicado pelas diferenças da concentração da  $\beta$ -ciclodextrina nos dois compostos. Esses compostos apresentam características mais amorfas que cristalinas. Ainda analisando o difratograma da FIGURA 52 para o composto LIOF 1:4 observa-se na região de  $2\theta=10^\circ$  a  $15^\circ$ , sinais de cristalinidade, podendo-se concluir que este composto apresenta-se como uma substância semicristalina.

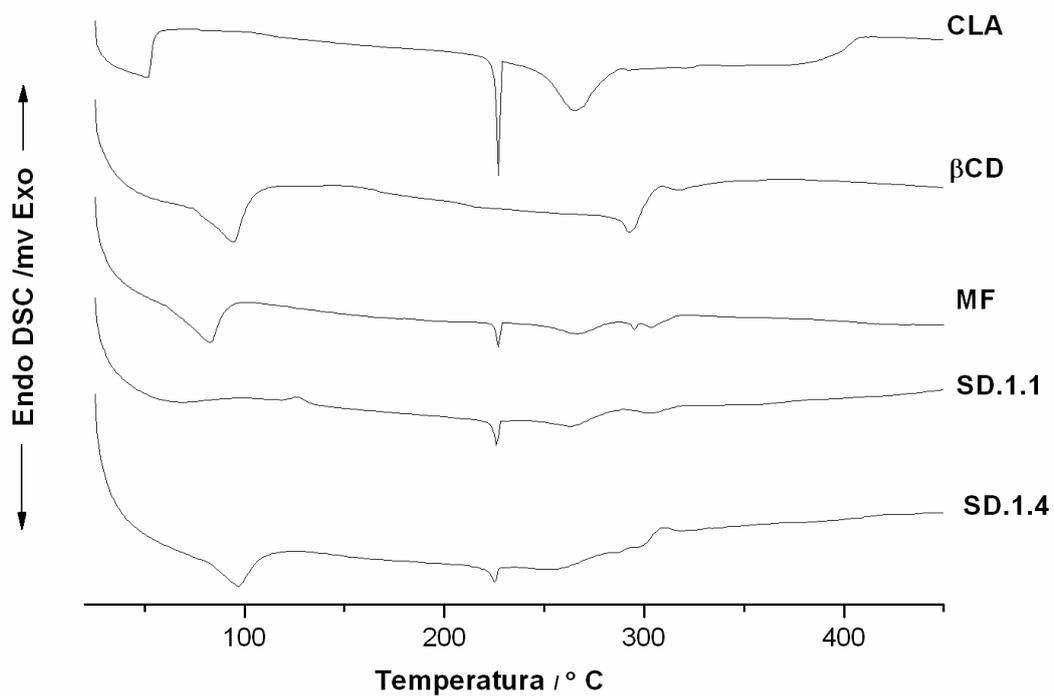
Os difratogramas para os compostos SD 1:1 e 1:4 mostraram-se mais diferentes entre si que os preparados por liofilização nas mesmas proporções molares. Observa-se que os compostos obtidos por técnicas diferentes mostraram difratogramas diferentes nas duas proporções.

#### 4.3.4 Análise Térmica

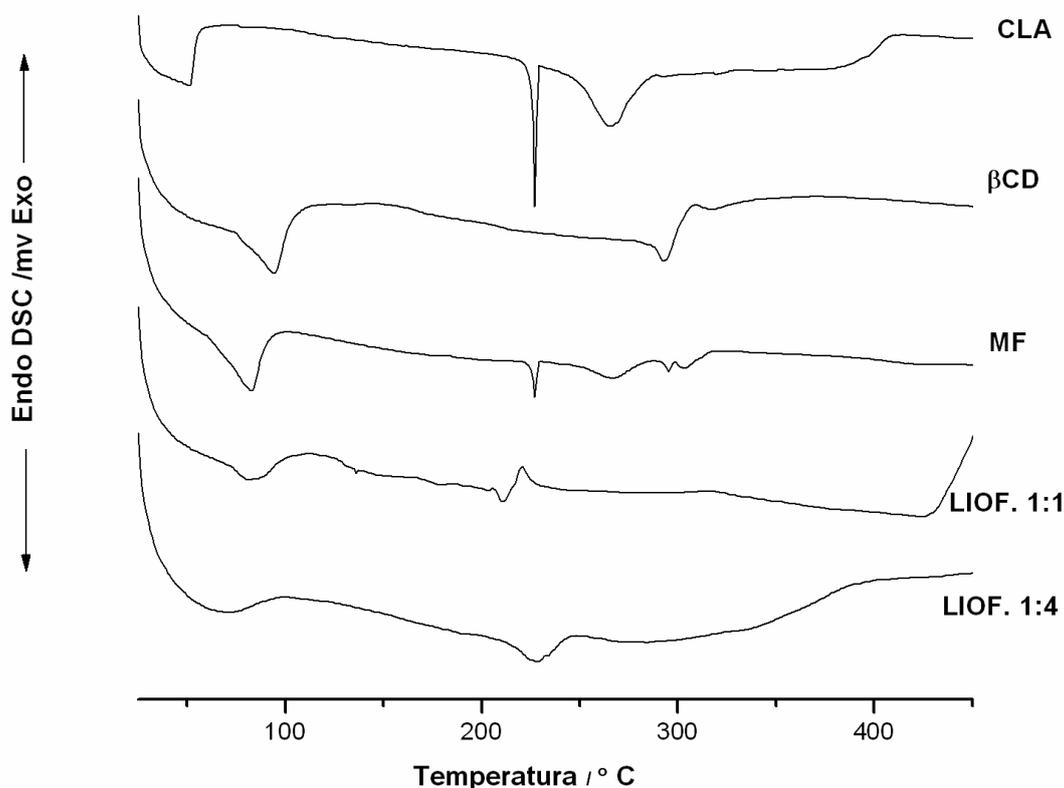
##### 4.3.4.1 Curvas de DSC

As curvas de calorimetria exploratória (DSC) para claritromicina e seus respectivos compostos de associação estão apresentadas nas FIGURAS 53 e 54.

A curva de calorimetria exploratória (DSC) obtida para claritromicina apresenta dois bandas endotérmicas, um bem definido e fino em aproximadamente  $227^\circ\text{C}$ , correspondente ao ponto de fusão do fármaco, e outro mais largo em aproximadamente  $267^\circ\text{C}$  associado à termod decomposição da CLA. A análise das curvas de DSC  $\beta$ -ciclodextrina foi realizada anteriormente (seção 4.1.4.1, página 50). Os resultados encontrados estão de acordo com os dados da literatura (ZHANG, ZHANG e ZHONG, 2007).



**FIGURA 53** - Curvas DSC para CLA,  $\beta$ CD, mistura física (MF) e os compostos de associação obtido pela técnica *spray drying* (SD), nas proporções molares 1:1 e 1.4



**FIGURA 54** - Curvas DSC para CLA,  $\beta$ CD, mistura física (MF) e os compostos de associação obtido pela técnica liofilização (LIOF), nas proporções molares 1:1 e 1:4.

Na mistura física, o perfil térmico da claritromicina é preservado, como também da  $\beta$ -ciclodextrina, isto sugere ausência de interação entre as duas substâncias em nível molecular na mistura preparada.

Os compostos de associação obtidos pela técnica de *spray drying* nas proporções molares 1:1 e 1:4 apresentaram bandas endotérmicas em torno de 227°C, características da claritromicina. O composto de associação obtido pela mesma técnica, porém na proporção molar 1:1, não apresentou o banda endotérmico em torno de 90°C, enquanto aquele preparado com a proporção molar 1:4 apresentou este banda, característico da  $\beta$ -ciclodextrina.

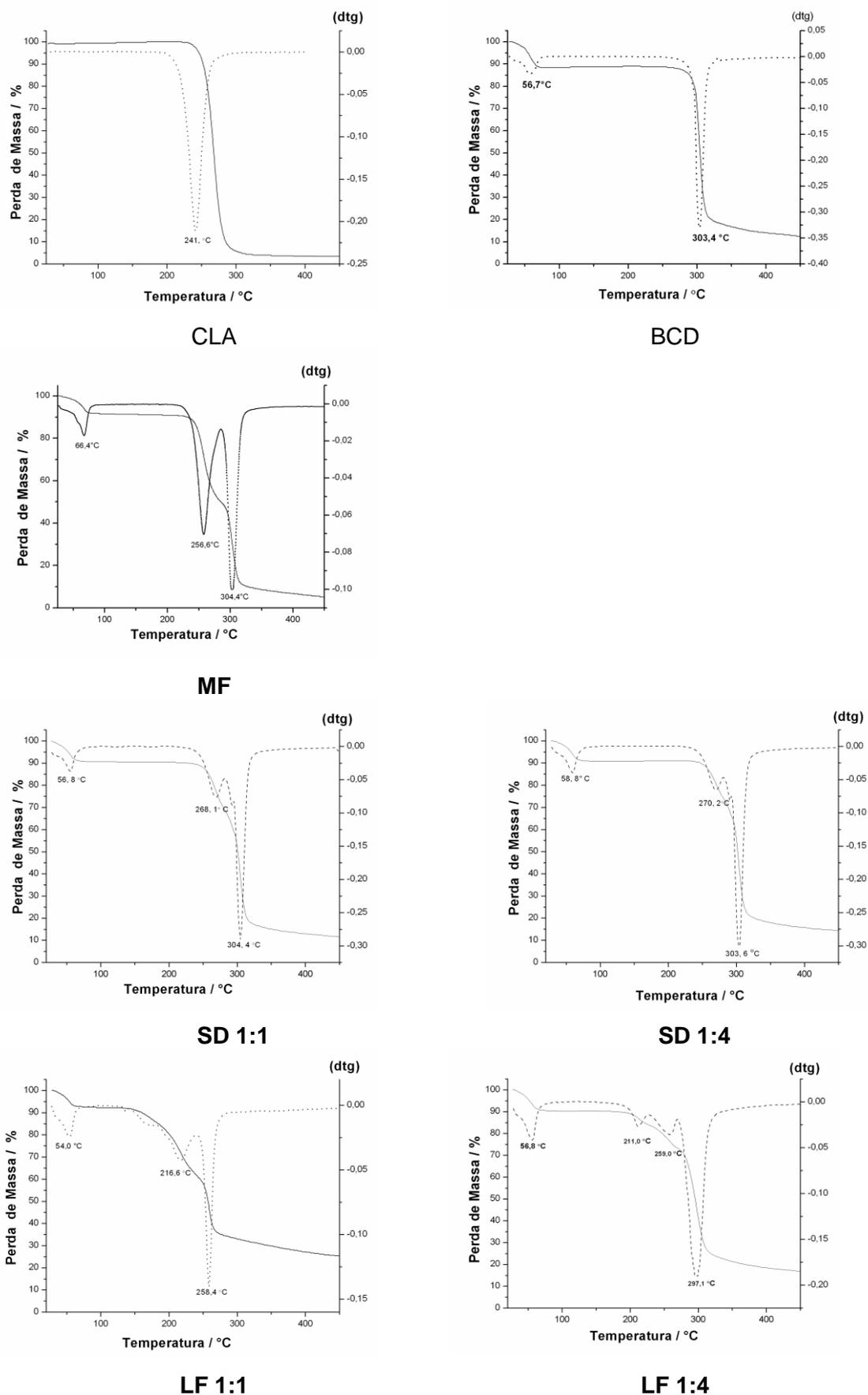
Entretanto, ao se analisar os perfis correspondentes aos compostos de associação obtidos pela técnica de liofilização nas diferentes proporções molares, é possível identificar que o perfil térmico da claritromicina e da  $\beta$ -ciclodextrina foi alterado, cedendo lugar a novos perfis térmicos que apresentam bandas endotérmicas e exotérmicas de larguras diferentes e em faixas de temperatura diferentes das substâncias puras originais. O composto de

associação na proporção molar de 1:4 apresenta uma maior descaracterização dos bandas das substâncias puras em relação às outras proporções molares, sugerindo uma maior interação do fármaco com a  $\beta$ -ciclodextrina nesta concentração molar.

Somente os resultados de DSC não permitem afirmar que ocorreu a associação da claritromicina na cavidade da molécula de  $\beta$ -ciclodextrina, mas as curvas térmicas dos compostos de associação obtidos pela técnica de liofilização sugerem alguma interação entre o fármaco e a  $\beta$ -ciclodextrina.

#### 4.3.4.2. Curvas de TG/DTG

A curva de TG/DTG para CLA,  $\beta$ CD, MF e os compostos de associação preparados pelas técnicas de *spray drying* e liofilização nas proporções molares de 1:1 e 1:4 são apresentadas na FIGURA 55. A curva de TG/DTG para CLA apresenta um único evento de termod decomposição em 240°C, correspondendo uma única perda de massa em torno de 90%.



**FIGURA 55 -** Curvas TG/DTG para CLA,  $\beta$ CD, MF, composto de associação (CLA:  $\beta$ CD) preparado pelos métodos de liofilização e *spray drying* nas proporções molares 1:1e 1:4.

Já a curva TG para a  $\beta$ CD apresenta uma perda de 15% em massa a uma temperatura de até 100°C, correspondente à perda das moléculas de água da cavidade da ciclodextrina. Observa-se uma estabilidade térmica até 300°C e, posteriormente, a termodecomposição da molécula na faixa de 300 a 350°C.

O perfil geral da curva de termodecomposição para a mistura física CLA +  $\beta$ CD é diferente do fármaco e também da ciclodextrina, sendo observadas perdas de massa de 15% em torno de 66°C, correspondendo à perda das moléculas de água da cavidade da ciclodextrina, e posteriormente em torno de 256°C, referente a uma perda de massa de 50% ligada à termodecomposição da CLA. Em 304°C a mistura física tem uma perda de massa de 90% sugestiva da termodecomposição da  $\beta$ CD.

Os compostos de associação apresentam três eventos referentes à termodecomposição. O primeiro evento está compreendido entre as temperaturas 54 e 59°C, correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 15% para os compostos obtidos pela técnica de *spray drying* e 25% para os compostos preparados pela técnica de liofilização, sugerindo maior interação da CLA com a  $\beta$ CD por esta técnica.

O segundo evento ocorre em torno de 209°C a 259°C, correspondendo a uma perda de massa de 20%, e finalmente o último evento em torno de 300°C, correspondendo a uma perda de massa em torno de 90% e podendo ser atribuído à decomposição final do composto de associação. Pode-se observar que as curvas de termodecomposição diferem entre si nos resíduos intermediários e finais sugerindo que o composto de associação/fármaco apresenta estabilidade térmica diferente, dependendo da técnica de obtenção e da concentração da  $\beta$ -ciclodextrina.

De acordo com a curva DTG, LIOF1:4 apresenta termodecomposição mais lenta que os outros compostos, sugerindo maior estabilidade deste composto.

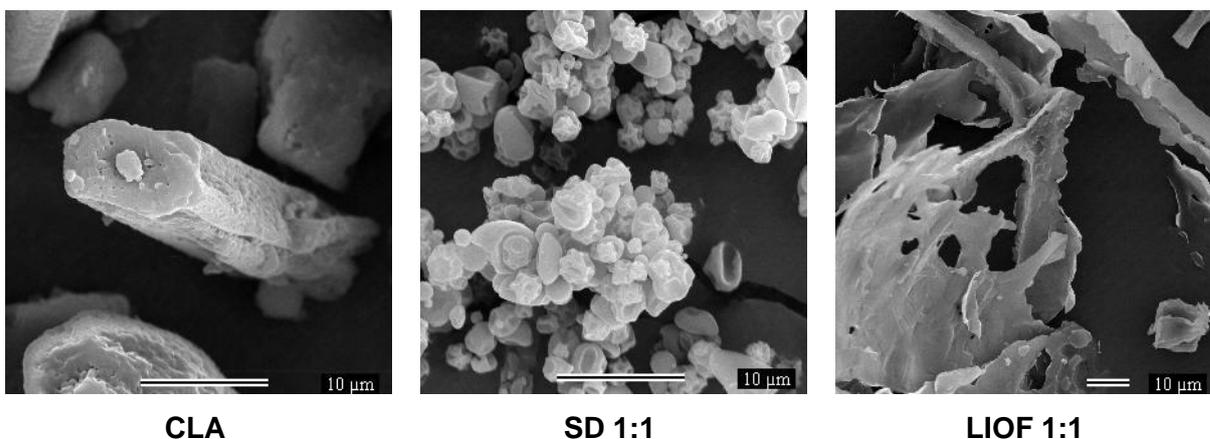
#### 4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Encontra-se a seguir a FIGURA 56 com as fotomicrografias correspondentes à CLA livre e aos compostos de associação obtidos por liofilização e *spray drying* na proporção molar 1:1, no aumento de 3000x. As fotomicrografias relacionadas às outras proporções molares não serão mostradas uma vez que se apresentaram muito semelhantes às dos compostos de associação obtidas na proporção molar 1:1.

Através desse aumento é possível observar que a técnica de *spray drying* gerou partículas esféricas irregulares e deformadas, devido ao processo de secagem, o que está

de acordo com os dados citados em literatura para esta técnica. Como citado anteriormente, a velocidade de injeção e o tempo de secagem podem modificar a morfologia das partículas, sendo que maiores velocidades levam à obtenção de superfícies mais porosas e irregulares (SALÚSTIO *et al.*, 2009). O composto obtido por liofilização mostrou partículas na forma de finas escamas.

Baseado nesses resultados observou-se que a técnica utilizada para secagem do composto de associação influencia diretamente na morfologia da partícula bem como no seu tamanho, e que o composto de associação se diferencia muito da estrutura do fármaco.

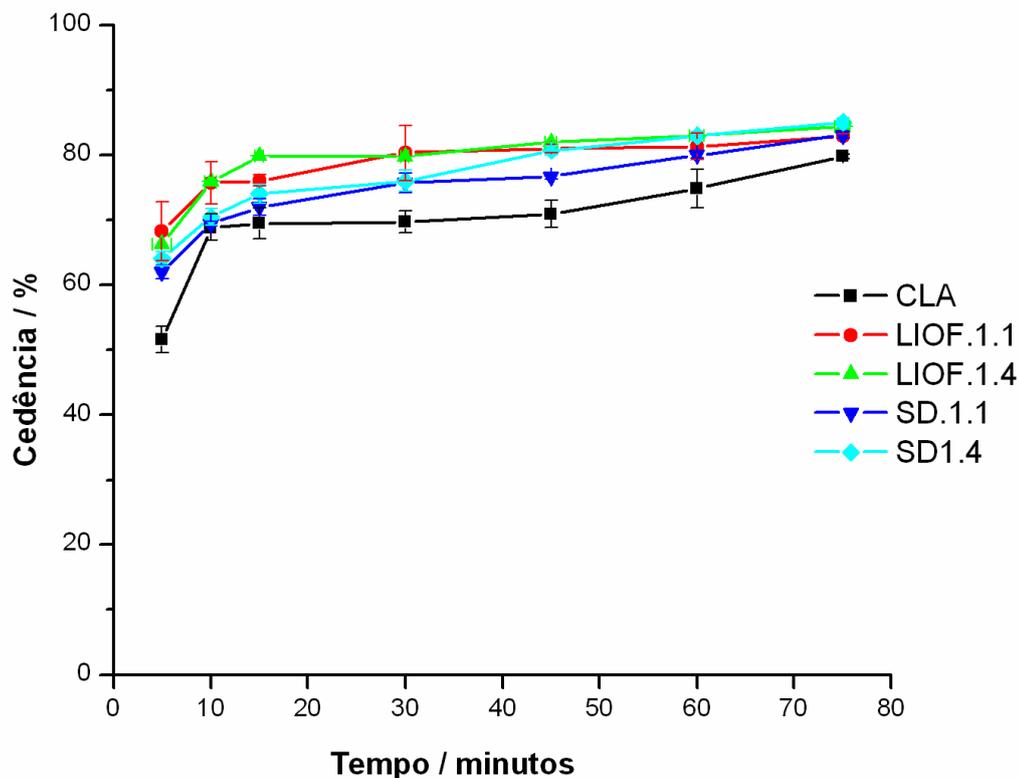


**FIGURA 56** - Fotomicrografias para claritromicina e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização na proporção molar 1:1

#### 4.3.6. Perfil dissolução

Como já mencionado anteriormente, o estudo de perfis de dissolução é uma ferramenta importantíssima na avaliação da solubilidade de fármacos, por isso realizou-se também o estudo de dissolução da claritromicina e seus compostos de associação, com o objetivo de verificar ganho de solubilidade ou não quando a claritromicina encontra-se associada à ciclodextrina.

Os perfis de dissolução da CLA pura e dos compostos foram estudados em tampão pH 5,0 e em água como mostrado nas FIGURAS 57 e 68. Os valores de dissolução foram expressos em porcentagem de fármaco dissolvido.



**FIGURA 57** - Perfil de Dissolução para claritromicina 50 mg e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4 em tampão acetato de sódio pH 5,0.

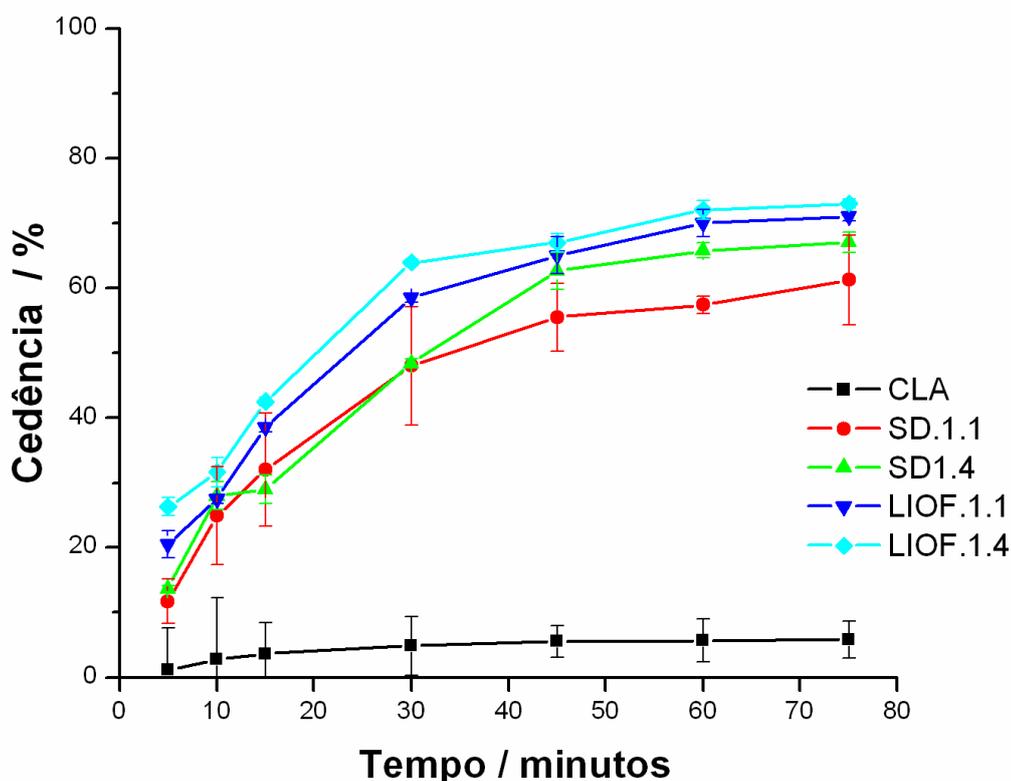
Os resultados obtidos em tampão pH 5,0 demonstraram que aos cinco minutos a claritromicina pura apresentou uma dissolução de 50%, enquanto os compostos de associação obtidos pela técnica de *spray drying* apresentaram uma dissolução em torno de 60% e os compostos preparados por liofilização apresentaram em torno de 70% de dissolução no mesmo tempo. Esta diferença de solubilidade entre os compostos é entendida, uma vez que os resultados de análise térmica demonstraram maior interação da claritromicina com a  $\beta$ CD quando preparados pela técnica de *spray drying*.

O gráfico de dissolução mostra um aumento de solubilidade para a claritromicina de 14% ao final de 75 minutos, enquanto os compostos de associação apresentaram um aumento médio de solubilidade de aproximadamente 22%, demonstrando que a associação da claritromicina na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina aumentou a solubilidade do fármaco.

Observa-se também que os compostos preparados nas proporções molares de 1:1 e 1:4 não apresentaram diferenças relevantes de solubilidade em todos os tempos de coleta e

o aumento de solubilidade obtido está de acordo com os dados demonstrados por Zang *et al.* em 2007.

O perfil de dissolução realizado em água para CLA e seus compostos de associação (FIGURA 58) mostra que aos cinco minutos a CLA tem uma solubilidade de 1,13%, enquanto que os compostos de associação obtidos pela técnica de *spray drying* apresentaram uma dissolução em torno de 11% e os preparados por liofilização apresentaram em torno de 20 a 26% de solubilidade. Esta diferença de solubilidade entre os compostos obtidos por técnicas diferentes também foi verificado no estudo de perfil de dissolução em tampão. É entendido neste caso que a técnica influenciou na maior ou menor interação do farmaco com a  $\beta$ CD.



**FIGURA 58-** Perfil de Dissolução para claritromicina e os compostos de associação preparados por *spray drying* e liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:4 em água.

Aos trinta minutos observa uma solubilidade para CLA de 6% e esta solubilidade é mantida até o final do estudo. Os compostos de associação obtidos por *spray drying* apresentaram uma dissolução de 48%, enquanto os obtidos por liofilização apresentaram uma dissolução entre 58-64%.

O gráfico mostra que aos 60 minutos os compostos de associação apresentaram um aumento de solubilidade médio de 12%, chegando ao final com uma solubilidade máxima de 71%. Os compostos obtidos por liofilização apresentaram maior solubilidade em água que aqueles obtidos por *spray drying*, o que pode ser entendido, uma vez que os dados de análise térmica mostraram maior interação da CLA com  $\beta$ -ciclodextrina.

A diferença de solubilidade apresentada pela claritromicina nos diferentes meios de dissolução, tampão e água, pode ser explicada, pelo fato da sua solubilidade ser dependente de pH (SALEM e DUZGUNES, 2003).

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que descreve as diferenças nas fases sólidas como sendo responsáveis pelas diferenças de solubilidade do fármaco (BLAGDEN *et al.*, 2007). Por exemplo, material amorfo apresenta maior solubilidade que o cristalino por ser mais reativo, devido à sua maior atividade termodinâmica, e consequentemente materiais amorfos são considerados mais higroscópicos quando comparados com os sólidos cristalinos (BLAGDEN *et al.*, 2007; ZHANGA *et al.*, 2004). Estes resultados estão de acordo com os dados de DRX, uma vez que a CLA apresentou-se como um pó cristalino e um processo de amorfização foi observado para ambos os compostos de associação. Cristalinidade e amorfidade são fatores importantes que estão relacionados com a solubilidade de compostos (PIRES *et al.*, 2011; ZHANGA *et al.*, 2009). Com base nesses resultados, pode-se sugerir que as ciclodextrinas tiveram um papel fundamental no aumento da solubilidade da CLA em água.

#### 4.3.7 Atividade antimicrobiana da claritromicina e de seus respectivos compostos de associação.

Foi avaliada a atividade antimicrobiana da claritromicina e de seus respectivos compostos de associação preparados com  $\beta$ -ciclodextrina, nas proporções molares 1:1 e 1:4, utilizando-se o teste de efeito inibidor do produto, tanto por diluição do caldo em tubos de ensaio como por plaqueamento, e os resultados são mostrados nas TABELAS 7 e 8 respectivamente.

A literatura relata estudos de atividade antimicrobiana até a concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$ . A princípio foi realizado o estudo até esta concentração, mas, como todos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana, estendeu-se o estudo até a concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  com o objetivo de verificar a que concentração o composto de associação não teria mais atividade sobre o microrganismo.

A TABELA 8 mostra os resultados do teste realizado por diluição do caldo caseína soja em tubos de ensaio. Observa-se que a claritromicina utilizada na preparação dos compostos de associação apresentou turvação do meio a partir da concentração 4 $\mu$ g/mL, enquanto os respectivos compostos de associação não apresentaram turvação do meio em nenhuma concentração estudada, mostrando-se mais eficazes que a claritromicina livre.

**TABELA 7-** Efeito inibidor do produto - diluição em caldo para claritromicina (A),  $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de associação LIOF (1:1 e 1:4) e SD (1:1 e 1:4)

Concentração ( $\mu$ g/mL)	P.C.A	CLA (A)	$\beta$ CD	Composto de associação obtido por Liofilização		Composto de associação obtido por <i>spray drying</i>	
				1:1	1:4	1:1	1:4
128	NHC	NT	T	NT	NT	NT	NT
64	NHC	NT	T	NT	NT	NT	NT
32	NHC	NT	T	NT	NT	NT	NT
16	NHC	NT	T	NT	NT	NT	NT
8	NHC	NT	T	NT	NT	NT	NT
4	NHC	T	T	NT	NT	NT	NT
2	NHC	T	T	NT	NT	NT	NT
1	NHC	T	T	NT	NT	NT	NT
0,5	NHC	T	T	NT	NT	NT	NT
0,25	NHC	T	T	NT	NT	NT	NT

Legenda: P.C.A – Agar padrão para contagem; T – turvou (houve crescimento do microorganismo, NT- não turvou (não houve crescimento do microorganismo); NHC- não houve crescimento (meio encontrava estéril).

A fim de confirmar os resultados obtidos referentes ao teste efeito inibidor do produto por diluição do caldo, realizou-se o plaqueamento do meio contido nos tubos de ensaio, para claritromicina,  $\beta$ -ciclodextrina e os respectivos compostos de associação. Observou-se que a claritromicina apresentou crescimento bacteriano até a concentração 4 $\mu$ g/mL, enquanto os compostos de associação, independente da proporção molar em que foram preparados, apresentaram crescimento da cepa *Staphylococcus aureus* (lote 6538) abaixo da concentração de 1 $\mu$ g/mL.

**TABELA 8-** Efeito inibidor do produto, método de recuperação de microrganismos para claritromicina (A),  $\beta$ -ciclodextrina e seus compostos de associação LIOF (1:1 e 1:4) e SD (1:1 e 1:4)

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	CLA (A)	$\beta\text{CD}$	Composto de associação obtido por Liofilização		Composto de associação obtido por <i>spray drying</i>	
			1:1	1:4	1:1	1:4
128	0	+ 300	00	00	00	00
64	0	+ 300	00	00	00	00
32	0	+ 300	00	00	00	00
16	0	+ 300	00	00	00	00
8	0	+ 300	00	00	00	00
4	28	+ 300	00	00	00	00
2	32	+ 300	00	00	00	00
1	33	+ 300	21	32	22	29
0,5	41	+ 300	29	39	25	27
0,25	37	+ 300	23	31	20	30
Controle Meio +MO	38	30	30	34	31	36

Realizou-se em paralelo o ensaio para a  $\beta$ -ciclodextrina, com objetivo de verificar se a mesma apresentava atividade antimicrobiana sobre a cepa *Staphylococcus aureus* (lote 6538) que foi objeto de estudo, e concluiu-se que a mesma não apresenta atividade antimicrobiana, uma vez que houve turvação em todas as concentrações e crescimento do microrganismo em todas as placas.

Podemos concluir que a claritromicina, quando complexada com a  $\beta$ -ciclodextrina, apresenta maior atividade antimicrobiana do que na forma livre para a cepa *Staphylococcus aureus* (lote 6538).

Capítulo 5

Conclusões

---

Com base nos resultados obtidos e discutidos pode-se concluir que:

- **Quanto aos compostos de inclusão**
  - Os compostos de inclusão foram preparados em proporções equimolares para os fármacos HTZ, PIO e ciclodextrinas. Após caracterização dos mesmos, os resultados dos estudos físico-químicos de análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raios-X de pó e RMN permitiram confirmar e determinar a interação hóspede-hospedeiro, sugerindo a formação do composto de inclusão.
  - Os compostos de associação foram preparados em proporções equimolares e não equimolares para o fármaco CLA e  $\beta$ -ciclodextrina. Após caracterização dos mesmos, os resultados dos estudos físico-químicos de análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raios-X de pó e RMN permitiram confirmar e determinar a interação hóspede-hospedeiro, sugerindo a formação do composto de associação.
- **Quanto à técnica de obtenção dos compostos de inclusão**
  - Quanto à hidroclorotiazida:
    - Com base nos resultados pode-se concluir que os três métodos foram eficientes para obtenção dos compostos HTZ: $\beta$ CD. Dentre eles o mais promissor é o método de atomização utilizando-se leito fluidizado, por mostrar ser mais eficiente no processo de inclusão e também por ser de fácil escalonamento industrial
    - Dentre as técnicas de atomização estudadas, a técnica de spray drying proporcionou a obtenção de esferas mais regulares.
  - Quanto ao cloridrato de pioglitazona
    - Os dados de caracterização em estado sólido e em solução permitiram concluir a formação do composto de inclusão tanto com  $\beta$ CD quanto com a HP $\beta$ CD.

- O composto de inclusão obtido com HP $\beta$ CD apresentou esferas mais deformadas, porém a morfologia da esfera não influenciou na velocidade de dissolução do composto de inclusão.
- Observou-se uma maior estabilidade térmica para o composto preparado com  $\beta$ CD em relação ao composto obtido com HP $\beta$ CD
- O aumento da solubilidade da pioglitazona pode ser atribuído aos fenômenos da inclusão e ao processo de amorfização promovido pela técnica de spray drying.
- Quanto à claritromicina
  - Houve maior interação do fármaco com a  $\beta$ -ciclodextrina quando o composto foi obtido pela técnica de liofilização se comparado aquele obtido por *spray drying*.
- **Quanto à morfologia das partículas**
  - Para os fármacos HTZ, PIO e CLA a técnica de preparação do composto de inclusão influenciaram na morfologia das partículas obtidas.
- **Quanto aos perfis de dissolução**
  - Os ensaios de dissolução dos compostos de inclusão preparados a partir dos fármacos HTZ e PIO demonstraram um aumento de solubilidade significativo dos compostos de inclusão frente aos fármacos livres.
  - Os ensaios de dissolução dos compostos de associação obtidos com CLA apresentaram maiores diferenças na velocidade de dissolução em meio aquoso do que em tampão pH 5,0.
- **Quanto à atividade diurética**
  - Os resultados *in vivo* demonstraram maior atividade diurética do composto de inclusão já nas primeiras horas, quando comparado ao fármaco puro.
- **Determinação da atividade antimicrobiana**
  - Os resultados microbiológicos obtidos a partir da exposição da claritromicina livre e dos seus respectivos compostos de inclusão ao microrganismo (*Staphylococcus*

*aureus* lote 6538) demonstraram que a claritromicina quando associada a  $\beta$ -ciclodextrina, apresenta maior atividade antimicrobiana do que na forma livre para a cepa *Staphylococcus aureus* (lote 6538), independentemente da proporção molar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABIQUIFI – Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos. Mercado: estatísticas. Disponível em <[http://www.abiquifi.org.br/mercado\\_estatisticas.html](http://www.abiquifi.org.br/mercado_estatisticas.html)>. Acesso em 19 de jul. de 2011.
- ACECVES-HERNANDEZ, J. M.; AGACINO-VALDÉS, E.; PAZ, M.; HINOJOSA-TORRES, J. Experimental and theoretical of the conformacional analysis of hydrochlorothiazide. *Journal of Molecular Structure*, v. 786, p.1-8, 2006.
- ALI, S. M.; UPADHYAY, S. K. Complexation studies of pioglitazone hydrochloride and b-cyclodextrin: NMR (1H, ROESY) spectroscopic study in solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 62, p.161–165, 2008.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v.12, p.413-420, 1995.
- ANTONIADOU-VYZA, E., BUCKTON, G., MICHAELAS, S. G., LOUKAS, Y. L., EFENTAKIS, M. The formation of an inclusion complex of methocarbamol with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: the effect on chemical stability, solubility ad dissolution rate. *International Journal Pharmaceutical*, v.58, p.233-239, 1997.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta de Produtos: medicamentos. Disponível em <[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp)>. Acesso em 20 de jun. de 2011.
- AULTON, M. E. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. New York: Churchill Livingstone. 2ª Edição. 2001. 752p
- AUNGST, B.; SHEN, D.D. Gastrointestinal absorption of toxic agents. *Gastrointestinal Toxicology*. Elsevier, Amsterdam, p.29-56,1986.
- AVRAMOV-IVIC, M. L.; PETROVIC, S.D.; VONMOOS, F.; MIJIN, D. Z.; ZIVKOVIC, P.M., DRLJEVIC, K.M. The qualitative electrochemical determination of clarithromycin and spectroscopic detection of its structural changes at gold electrode. *Eletrochemistry Communications*, v. 9, p.1643 – 1647, 2007
- BALAN, G.; TIMMINS, P.; GREENE, D.S.; MARATHE, P.H. In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.90, p.1176-1185, 2001.

- BETTINETTI, G.; NOVAK, C.; SORRENTI, M. Thermal and structural characterization of commercial  $\alpha$ -, $\beta$ -,  $\delta$ -cyclodextrins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.68, p.517-529, 2002.
- BLAGDEN, N.; De Matas, M.; Gavan, P.T.; York, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.617–630, 2007.
- BRANCHU, S.; ROGUEDA, P. G., PLUMB, A. P., COOK, W. G. A decision-support tool for the formulation of orally active, poorly soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.32, p.128–139, 2007.
- BRASIL. Lei 5.991 de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos e dá outras providências. In: [www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei\\_5991\\_73.ht/](http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_5991_73.ht/)=Brasília: ANVISA, 2004.
- BRITTO, R. R. Efeitos da pioglitazona sobre a resistência à insulina e à leptina na síndrome dos ovários policísticos. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2006.
- BROW, C. K.; Nickerson, H.P.C.B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH P. A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharmaceutical technology*, v.28, 56-65, 2004.
- CABALEIRO-LAGO, C., NILSSON, M., VALENTE, A.J.M., BONINI, M., SÖDERMAN, O. NMR diffusometry and conductometry study of host-guest association between  $\beta$ -cyclodextrin and dodecane 1,12-bis(trimethylammonium bromide). *Journal of Colloid and Interface Science*, v.300, p.782-787, 2006.
- CABRAL-MARQUES, H.; ALMEIDA, R. Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.73, p.121-129, 2009.
- CARRIER, R. L.; MILLER, L. A., AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability *Journal of Controlled Release*, v. 123 78–99, 2007.
- CHARMAN, W.N.; PORTER, C.J.H.; MITHANI, S.; DRESSMAN, J.B. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.86, p.269-279,1997.
- CHU, S. Y.; Wilson, D.S.; GUAY, D.R; CRAFT, C. Clarithromycin pharmacokinetics in healthy Young and elderly volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 32, p. 1045-1049. 1992.

CLARIDGE, T.D.W., High resolution NMR Techniques in Organic Chemistry – Pergamon, (1999), 382p.

COIMBRA, R. R. B. Efeitos da pioglitazona sobre a resistência dos ovários policísticos. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2006.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRITIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.36, p.13-21, 2000.

COOK, T.J.; SHENOY, S.S. Intestinal permeability of chlropyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, v.184, p.125-133, 2003.

COSTA, P., LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Port. Farm., Lisboa*, v. 59, n.4, p. 181-190, 1999.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista Brasileira*, v.28, p.1-9, 2007.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Drug Discovery*, v.3, p.1023–1035, 2004.

DENADAI, A. M. L. ; SANTORO, M. ; DA-SILVA, L. H. ; T., V. A. ; SANTOS, R. A. S. ; Sinisterra R. D. . Self-Assembly Characterization of the beta-cyclodextrin and hydrochlorothiazide Mixture: NMR, Phase Solubility, ITC and QELS. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.55, p.41-49, 2006.

DUAN, M.S., et al., Cyclodextrin solubilization of the anticterial agents triclosan na triclocarban: Formation of aggregates end higer-order complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.297, p.213-222, 2005.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWÉ, D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivates, part I. *Pharmaceutical Technology*, v.6, 26-34, 1990.

DUPUY, N.; BARBRY, D.; BRIA, M.; MARQUIS, S.; VRIELYNCK, L.; KISTER, J. <sup>1</sup>H NMR study of inclusion compounds of phenylurea derivatives in β-cyclodextrin. *Spectrochimica Acta, Part A*, v.61, p.1051-1057, 2005.

EDDINGTON, N.D.; MARROUM, P.; UPPOOR, R.; HUSSAIN, A.; AUGSBURGER, L. Development and internal validation of an in vitro-in vivo correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. *Pharmaceutical Research*, v.15, p.466-473, 1998.

FDA – GUIDANCE FOR INDUSTRY. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). August, 2000.

FERNANDES S. A. Técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  aplicadas a complexos supramoleculares de calixarenos quirais envolvendo reconhecimento quiral e redução assimétrica – Tese de Doutorado, Campinas: UNICAMP/IQ, 2005, 200p;

FERNANDES, C. M.; VIEIRA, M. T.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.15, p.79–88,2002.

FIELD, M.J.; Stanton, B.A.; Giebisch, G.H.; Differential acute effects of aldosterone, dexamethasone, and hyperkalemia on distal tubular potassium secretion in the rat kidney, *Journal Clinical Investigation*, v.74 p.1792–1802, 1984.

FRIDRIKSDÓTTIR, H.; LOFTSON, T.; GUDMUNDSSON, J. A.; BJARNASSON, G. J.; KJELD, M.; THOSTEINSSON, T. Design and in vivo testing of 17- $\beta$ -estradiol-HP- $\beta$ -CD sublingual tablets. *Die Pharmazie*, v.51, 39-42, 1996.

FRÖMMING, K. L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in Pharmacy. Dordrecht: Klumer Academic Publishers. 1993. 225p.

GAJARE, P.; PATIL, C.; KALYANE, N.; PORE, Y. Effect of hydrophilic polymers on pioglitazone complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v.4, p.891-897, 2009.

GARNERO, C.; ZOPPI, A.; GENOVESE, D.; LONGHI, M. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: aggregate and complex formation. *Carbohydrate Research*, v.345, p.2550–2556, 2010.

GIODARNO, F., NOVAK, C., MOYANO, J.R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim Acta*, v.380, p.123-151, 2001.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, 2006, capítulo 29, p.657-686.

HARADA, A.; YING HU.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, S. Preparation and properties of inclusion compounds of ferrocene and its derivatives with cyclodextrin. *Journal of the Chemical Society Dalton Transactions*, v.3, p.729-732, 1988.

HUSSEIN, K.; TÜRK, M.; WAHL, M. A. Comparative Evaluation of Ibuprofen/ $\beta$ -Cyclodextrin Complexes Obtained by Supercritical Carbon Dioxide and Other Conventional Methods. *Pharmaceutical Research*, v. 24, p.585-592, 2007.

JANSEN, C. E. M. Dispositivos de liberação controlada contendo antagonista do receptor AT1 ou estatinas: Preparação, caracterização físico-química e avaliação do efeito anti-hipertensivo. 2010. 144p. Tese de doutorado. Departamento de Química – ICEX – UFMG. Belo Horizonte.

JENSEN, C.E.; Santos, R.A.S.; Denadai, A.M.L.; Santos, C.F.F.; Braga, A.N.G.; Sinisterra, D.S. Pharmaceutical Composition of Valsartan: $\beta$ -Cyclodextrin: Physico-Chemical Characterization and Anti-hypertensive Evaluation. *Molecules*, v.15, p.4067-4084, 2010.

JOHNSON JR., C. S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *NMR Spectroscopy*, v.34, p.203-256, 1999.

JOHNSON, K. C. Dissolution: Fundamentals of In Vitro Release and the Biopharmaceutics Classification System. In: CHILUKURI, D. M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. Pharmaceutical Product Development: In Vitro-In Vivo Correlation. *Drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: *Informa Healthcare*, 2006. v.165.

KASSIM, A. N.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN C.; BERMEJO, M.; LENNERNA, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties do WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, p.85-96, 2004.

KASSIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAB, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties do WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, p.85-96, 2004.

KATORI, N.; AOYAGI, N.; TERAOKA, T. Estimation of agitation intensity in the GI tract in humans and dogs based on in vitro/in vivo correlation. *Pharmaceutical Research*, v.12, p.237-243, 1995.

KAUKONEM, A.M.; LENNERNANS. H.; MANNERMAN, J. P. Water-soluble beta-cyclodextrins in pediatric oral solutions of spironolactone: Preclinical evaluation of spironolactone bioavailability from solution of beta-cyclodextrin derivatives in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.58, p.611-619, 1998.

KOHATA, S.; KOUKI, J.; AKIRSA, O. Thermal decomposition of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and modified  $\beta$ -CyD) and of metal-( $\beta$ -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochim Acta*, v.217, p.187-198, 1993.

- KONEMAN, Elmer W. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.
- KRISHNA, R.; YU, L. Biopharmaceutics Applications in Drug Development. Springer US. 1ª Ed., 2009, 420p.
- LOFTSSON, t.; Brewster, M. E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, p.1017-1025, 1996.
- LIN, S.Y; KAO, Y. H. Solid particulates of drug- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v.56, p 249 – 259, 1989.
- LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.44, p.63–67, 2002.
- LOFTSSON, T., et al., Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p.95-10, 1993.
- LOFTSSON, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal Pharmaceutical*, v.329, p.1–11, 2007.
- LOFTSSON, T.; HREINSDOÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.57, p.545–552, 2007.
- MACHERAS, P.; ARGYRAKIS, P. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharmaceutical Research*, v.14, p.842-847, 1997.
- MARTINDALE: The extra pharmacopoeia / James E.F. Reynolds (Ed.). London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.
- MARTINEZ, M. N., AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, n.6, p.620-643, 2002.
- MATERSON. B.; MD; MBA. Historical perspective of low –vs. high-dose diuretics. *Journal of the American Society of Hypertension*, v.6, p.373-380, 2007.
- MENON, D.; El-Ries, M.; Alexander, K. S.; Riga, A.; Dollimore, D. A thermal analysis study of the decomposition of hydrochlorothiazide. *Instrumentation Science & technology*, v.30, p.329-340, 2002.
- MOUGENOT. N.; Médiani, O.; Lechat, P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology. Research*, v.51, p. 359-365, 2005.

NERY, C. G. C.; PIRES, M. A. S.; PIANETTI, G. A.; SOARES, C. D. V. \*Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.44, p.61-73, 2008.

OPAS, Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus no Brasil, Série C. Projetos, Programas e Relatórios Brasília – DF 2004

OPIE, L.H., Kaplan, N.M.; Diuretics. *Drugs for the Heart*, (7th Ed.), p.74-99, 1998

ORGOVÁNYI, J.; PÖPPL, L.; -OTTA, K. H.; LOVAS, G. A. Thermoanalytical method for studying the guest content in cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.81, p.261–266, 2005.

PAULA, W. X. ; SINISTERRA, R. D.; SANTOS, R. A. S. ; BERALDO, H. O. . A Química Inorgânica no Planejamento de Fármacos Usados no Controle da Hipertensão. *Química Nova*, v. 6, p. 19-23, 2005.

PETERS, D. H.; CLISSOLD, S. P. Clarithromycin: a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potencial. *Drugs*, v. 44, p. 117-164. 1992.

PILCER, G.; VALDERBIST, F.; AMIGHI, K. Preparatin and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery. *Internatinal Journal of pharmaceutics*, v.365, p.162-169, 2009.

PIRES, M. A. S.; SANTOS, R.A.S.; SINISTERRA, D.S. Pharmaceutical Composition of Hydrochlorothiazide:β-Cyclodextrin:Preparation by Three Different Methods,Physico-Chemical Characterization and In Vivo Diuretic Activity Evaluation. *Molecules*, v.16, p.4482-4499, 2011.

POLLI, J.E.; CRISON, J.R.; AMIDON, G.L. Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p.753-761, 1996.

QI, H., NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H.Study of the interation between Beta-ciclodextrin and Chlorhexidine. *Pharmaceutical Research*, v.11, p.1207-1210, 1994.

RAHMAN, A., One and Two Dimensional NMR Spectroscopy.ed.; Elsevier: New York,1989

RAJENDRAKUMAR, K.; MADHUSUDAN, S.; PRALHAD, T. Cyclodextrin complexes of valdecoxib: properties and anti-inflammatory activity in rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.60, p.39–46, 2005.

RAO, B.S.; SESHASAYANA, A., SARADHI, S.V.P.; KUMAR, N.R.; NARAYAN, C.P.S.; MURTHY, K.V.R. Correlation of "in vitro" release and "in vivo" absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 230, p.1-9, 2001.

- ROSA, T. C. C. Dissolução Intrínseca de hidroclorotiazida de diferentes granulometrias e sua relação com a dissolução do ativo em comprimidos., 2005, 88p, Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Rio Janeiro-UFRJ.
- RUSSELL, N. R., McNamara, M. j. FT-IR and Raman spectral evidence for metal complex formation with  $\beta$ -cyclodextrin as a first sphere ligand. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.7, p.455-640, 1989.
- SAENGER, W., Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, p.344-346, 1980.
- SALÚSTIO, P.J.; FIGUEIRINHAS, J.L.; PINTO, J.F.; CABRAL MARQUES, H.M. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in  $\beta$ -cyclodextrin cavity. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, p.377–386, 2009.
- SCHEIDER, H. J.; Hachet, F.; Rudiger, V.; Ikeda, H.; NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*, v.98, p.1755-1785, 1998.
- SILVERSTAIN, R.M; BASSLER, G. C.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed.; Califórnia, 2007.
- SOUSA, F. B. ; DENADAI, A. M. L.; LULA, I.S.; NASCIMENTO, C. S.; FERNANDES, G. S. N.; LIMA, A. C.; AMEIDA, W. B.; SINISTERRA, R. D. Supramolecular Self-Assembly of Cyclodextrin and Higher Water Soluble Guest: Thermodynamics and Topological Studies. *Journal of the American Chemical Society*, v.130, p.8426–8436, 2008.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, 515-527, 2007.
- STEGEMANNA. S.; LEVEILLER. F.B.; FRANCHIC. D.; JONGD. H.; LIND'ENE. H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept\_european. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.31, 249–261, 2007.
- SZEJTLI J. Past present, and future of cyclodextrin. *Pure and Applied Chemistry*, v.76, 1825-45, 2004.
- TAKAGI, M.E.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; AMIDON, G.L. A provisional biopharmaceutical classification of top 200 oral drugs products in the United States Great Britain, Spain and Japan. *Molecular Pharmaceutics*, v.3, p.631-643, 2006.
- THE MERCK index. 14 ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 2006, 1741p.

THE NINTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS. May 31 - June 3, 1998, Santiago de Compostela. Proceedings... Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA: 31st ed.; General chapter number <1087>. The United States Pharmacopeial Convention: Rockville: Maryland, USA, 2008.

THOMPSON.D.O. Cyclodextrin- Enabling excipientes: Their present and future use in pharmaceuticals. *Drug carrier Systems*, v.14, p.1-104, 1997.

UEKAMA, K. Design and Evaluation of Cyclodextrin-Based Drug Formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, p.900—915, 2004.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*, v.98, p.2045-2076, 1998.

WATERBEEMD, H.; TESTA, B.; MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Wiley-VCH; 2ª Edição. 2008. 649p.

WHO –World Health Organization. Adherence to long-term therapies. Evidences for action, 2003.

WILLIAMS, J. D.; SEFTON, A. M. Comparison of macrolide antibiotics. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v.31, p.11-26, 1993.

WU, C. Y.; BENET, L. A.; Predicting drug disposition via application of BCS: transport / absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical Research*, v.22, p.11-23, 2005.

YU, L.X. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.270, p.221-227, 2004.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *International Journal of Pharmaceutical*, v.270, p.221-227, 2004.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.73, p.102-106, 2009.

ZANG , X.; WU, D.; LAI, J.; LU, Y.; YIN, Z.; & WU, W. Piroxicam/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating techning. *Journal Pharmaceutical Science*, v.98, p.665-675, 2009.

ZENG, J.; RENA, Y.; ZHOUA C.; YUA S.; CHEN W. Preparation and physicochemical characteristics of the complex of edaravone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p.1101–1105, 2011.

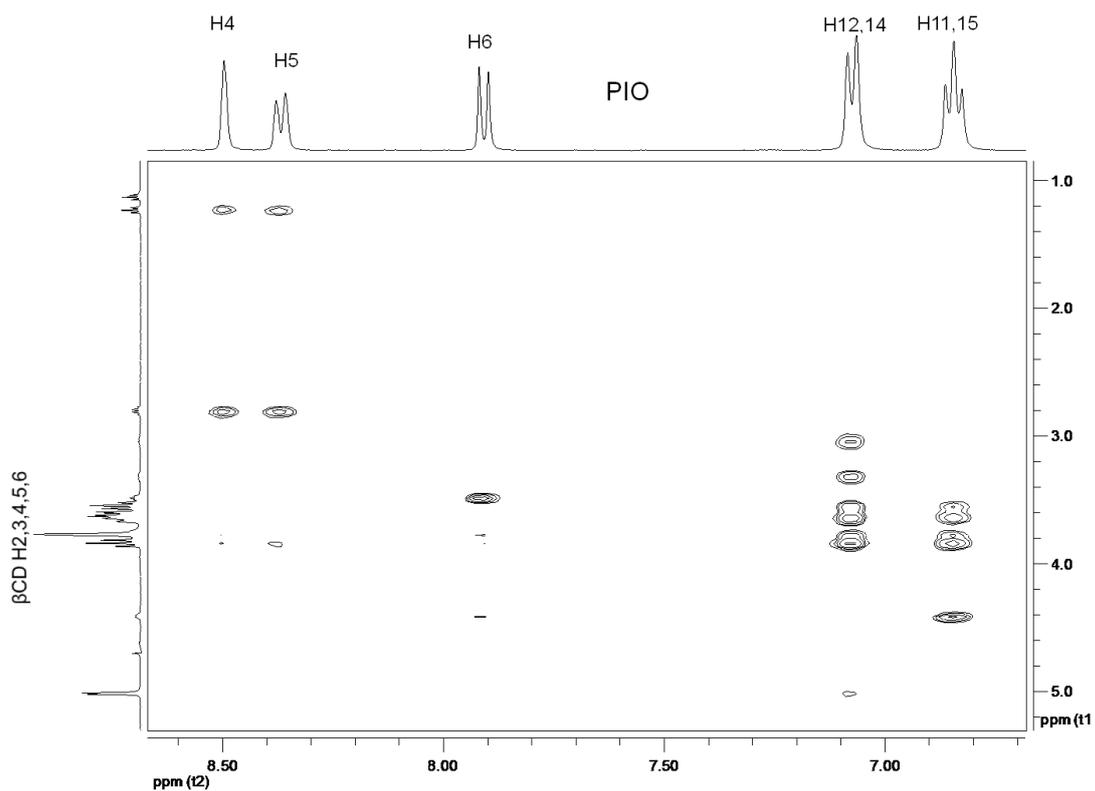
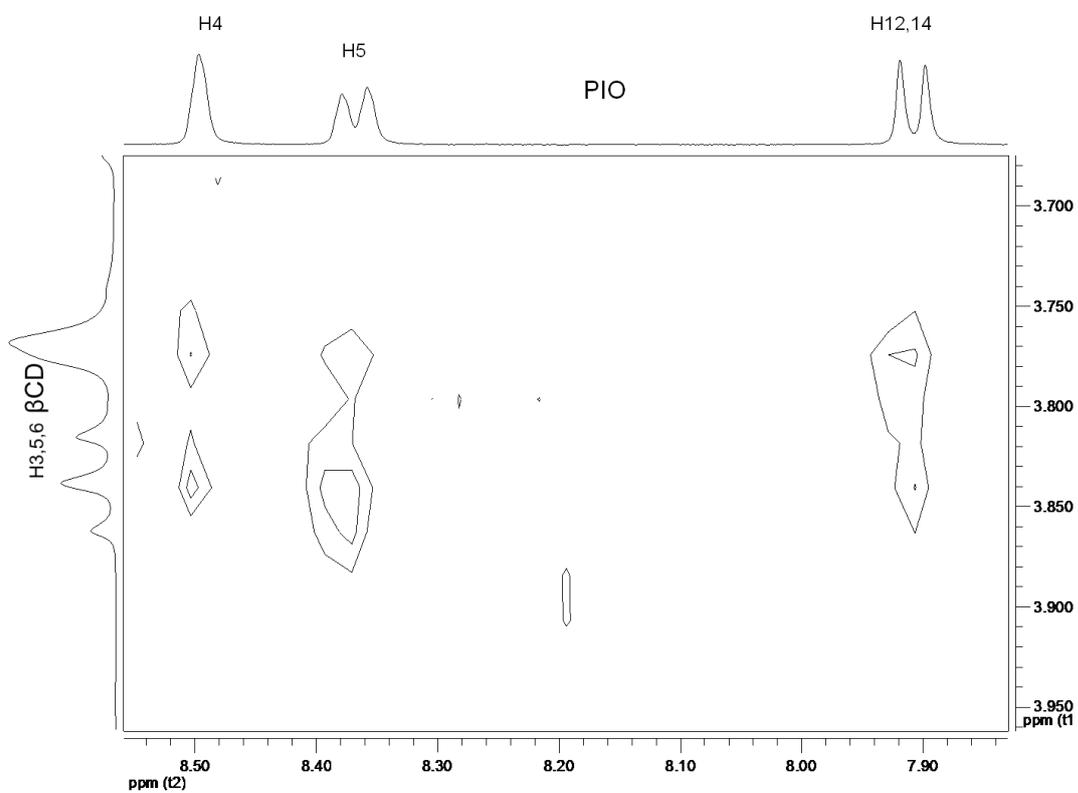
ZHANG, X.;ZHANG, Y.; ZHONG, D. Investigation and physicochemical Characterization of Clarithromycin-Citric Acid-Cyclodextrins Ternary Complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.33, p.163-171, 2007.

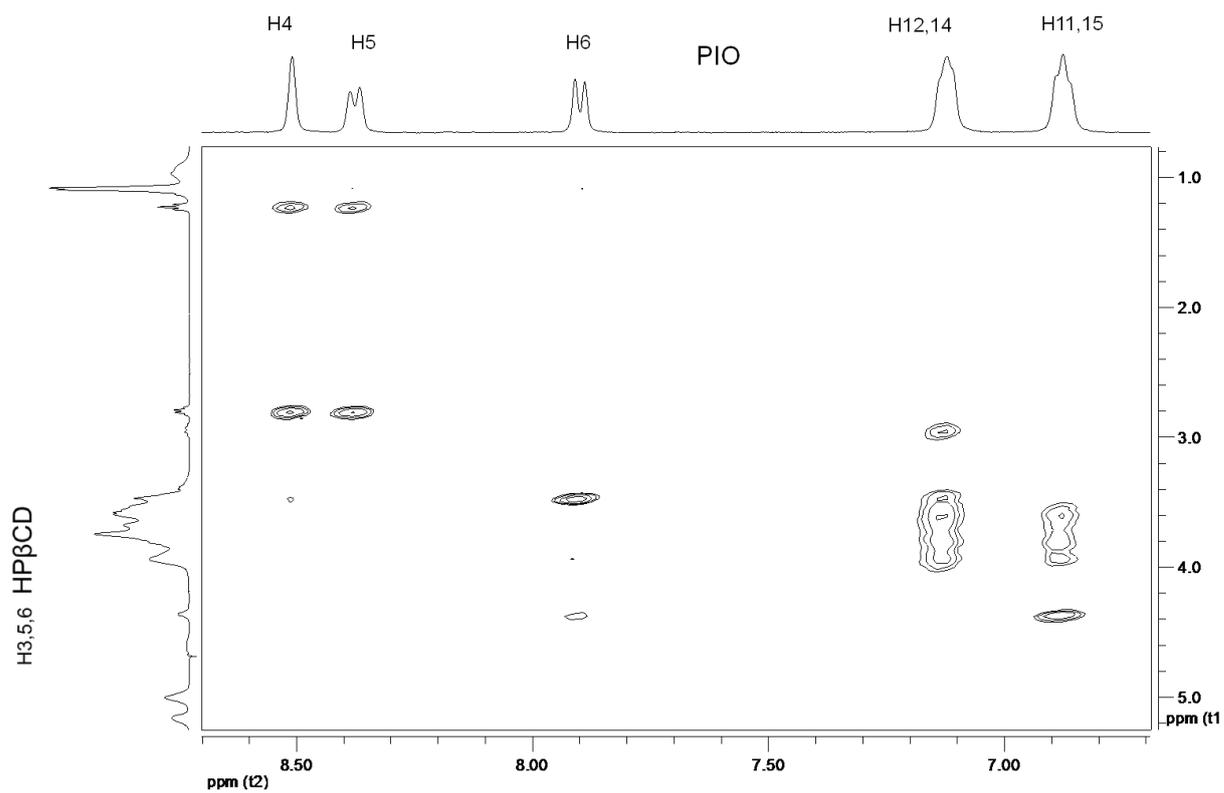
ZHANGA, F.; AALTONEN, J.; TIAN, F.; SAVILLE, D. J.; RADES, T. Influence of particle size and preparation methods on the physical and chemical stability of amorphous simvastatin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, p.64-70, 2009.

ZHANGA, G.G.Z.; LAWA, D.; SCHMITTB, E.A., QIUB, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.371– 390, 2004.



## Anexo 1

Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto PIO:βCD (400MHz, D<sub>2</sub>O)Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto PIO:βCD (400MHz, D<sub>2</sub>O)



Seção expandida do mapa de contorno ROESY para o composto PIO:HPβCD (400MHz, D<sub>2</sub>O)

Article

## Pharmaceutical Composition of Hydrochlorothiazide: $\beta$ -Cyclodextrin: Preparation by Three Different Methods, Physico-Chemical Characterization and *In Vivo* Diuretic Activity Evaluation

Maria Arlete Silva Pires <sup>1</sup>, Robson Augusto Souza dos Santos <sup>2</sup> and Rubén Dario Sinisterra <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: [sinisterra@ufmg.br](mailto:sinisterra@ufmg.br); Tel.: +55-31-3409-5778; Fax: +55-31-3409-5700.

Received: 29 April 2011; in revised form: 19 May 2011 / Accepted: 23 May 2011 /

Published: 27 May 2011

---

**Abstract:** Hydrochlorothiazide is a common diuretic antihypertensive drug of the thiazide family. Its poor aqueous solubility is one of the reasons for its limited bioavailability after oral administration. This work aimed at the development of a hydrochlorothiazide: $\beta$ -cyclodextrin (HTZ: $\beta$ -CD) pharmaceutical composition in order to improve water solubility and bioavailability of the drug. The HTZ: $\beta$ -CD complexes were prepared by three different methods: spray-drying, freeze-drying and fluid bed. Complexes were characterized by thermal analysis, Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy, powder X-ray diffractometry, NMR (2D-ROESY), scanning electron microscopy (SEM), particle analysis and intrinsic dissolution. The findings reveal that three binary systems prepared presented better solubility results in comparison with free HTZ. Increased diuretic effect was observed to HTZ: $\beta$ -CD obtained by fluid bed in comparison to free drug in rats. Results taken together suggest that pharmacological effect of HTZ in complex was increased by solubility improvement promoted by cyclodextrin.

**Keywords:** hydrochlorothiazide;  $\beta$ -cyclodextrin; intrinsic dissolution; diuretic

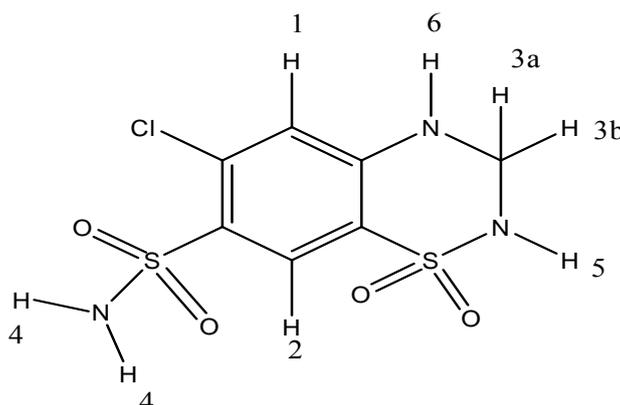
---

## 1. Introduction

Hypertension remains a major clinical challenge worldwide because of both direct consequences of high blood pressure such as cerebral hemorrhage, hypertensive heart failure and progressive renal failure. In developed countries, heart disease and stroke are the first and the third-ranked causes of morbidity and mortality, respectively [1]. Pharmacological treatment of hypertension consists in the use of drug therapies including association or not of diuretics, beta-blockers, calcium channel blockers, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II receptor (AT1) antagonist (ARA) [1,2-4].

Diuretics, in particular hydrochlorothiazide (HTZ) Figure 1, are often used in association with other drugs in the management of hypertension in patients with ischemic heart disease [5]. Thiazides affect the renal tubular mechanisms of electrolyte reabsorption, directly increasing excretion of sodium and chloride in approximately equivalent amounts. Indirectly, the diuretic action of hydrochlorothiazide reduces plasma volume, with consequent increase in urinary potassium loss, plasma renin activity, aldosterone secretion and decrease in serum potassium [6,7].

**Figure 1.** Structure of HTZ or 6-chloro-1,1-dioxo-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,2,4]-thiadiazine-7-sulfonamide(IUPAC nomenclature) [CAS number: 58-93-5].



According to the Biopharmaceutics Classification System (BCS) aqueous solubility and permeability are the most important variables affecting drug bioavailability. HTZ is classified as Class IV, where the drugs have low solubility and low permeability characteristics after oral administration [8]. Cyclodextrins are one of the available pharmaceutical strategies in order to circumvent these drawbacks [9,10].

Cyclodextrins (CDs) are cyclic ( $\alpha$ -1,4)-linked oligosaccharides of D-glucopyranose containing a relatively hydrophobic central cavity and a hydrophilic outer surface. CDs are able to form inclusion complexes with poorly water-soluble drugs. These inclusion complexes have been shown to improve stability, solubility, dissolution rate, and bioavailability [11-13]. This improvement in hydrophilicity may be attributed either to the formation of inclusion complexes or to the highly homogeneous assembly between CDs and drugs in the solid state. In most cases, this association increases the solubility of poorly soluble drugs. The drug-CD binary systems are also useful in dosage form development for increasing the solubility, dissolution, and absorption rates of poorly soluble drugs in tablet or capsule form [14].

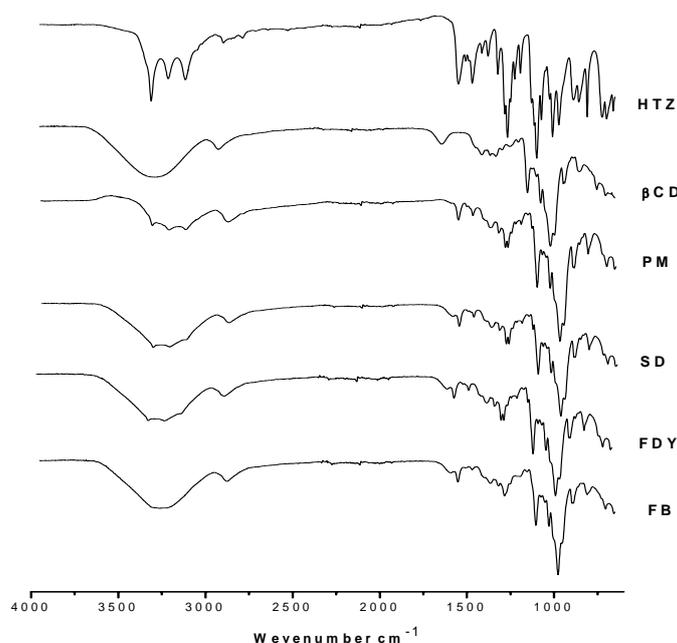
One can find some works in the state-of-the-art that describe the use of cyclodextrins with HTZ in solution for self-assembly systems [15], and the use of CDs to increase the pharmacotechnical and dissolution parameters of pharmaceutical formulations [16].

To the best of our knowledge there are no descriptions of the preparation of HTZ: $\beta$ -CD inclusion complexes by different methods and their complete physico-chemical characterization and diuretic evaluation in *in vivo* experimental models. Thus, the aim of this work was to investigate the effectiveness of  $\beta$ -CD containing systems in improving the solubility and the dissolution rate of HTZ. HTZ: $\beta$ -CD complex binary systems were prepared by three different methods: spray-drying (SD), freeze-dried (FDY) and fluid bed (FB) in order to understand which of these methods could be used to prepare these inclusion compounds in a greater scale pharmaceutical production. Complexes were characterized by thermal analysis, Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy, powder X-ray diffractometry, NMR (2D-ROESY), scanning electron microscopy (SEM), particle analysis, and intrinsic dissolution. *In vivo* experiments were performed in rats to evaluate the diuretic effects of the as prepared HTZ: $\beta$ -CD complexes.

## 2. Results and Discussion

Host:guest interaction in an inclusion complex is mediated by weak forces between molecules such as hydrogen bonds and hydrophobic interactions [3]. Figure 2 presents FTIR absorption spectra for HTZ,  $\beta$ -CD, physical mixture (PM) and HTZ: $\beta$ -CD obtained by three different techniques.

**Figure 2.** FTIR spectra for HTZ,  $\beta$ -CD, physical mixture (PM) and HTZ: $\beta$ -CD complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB) methods.

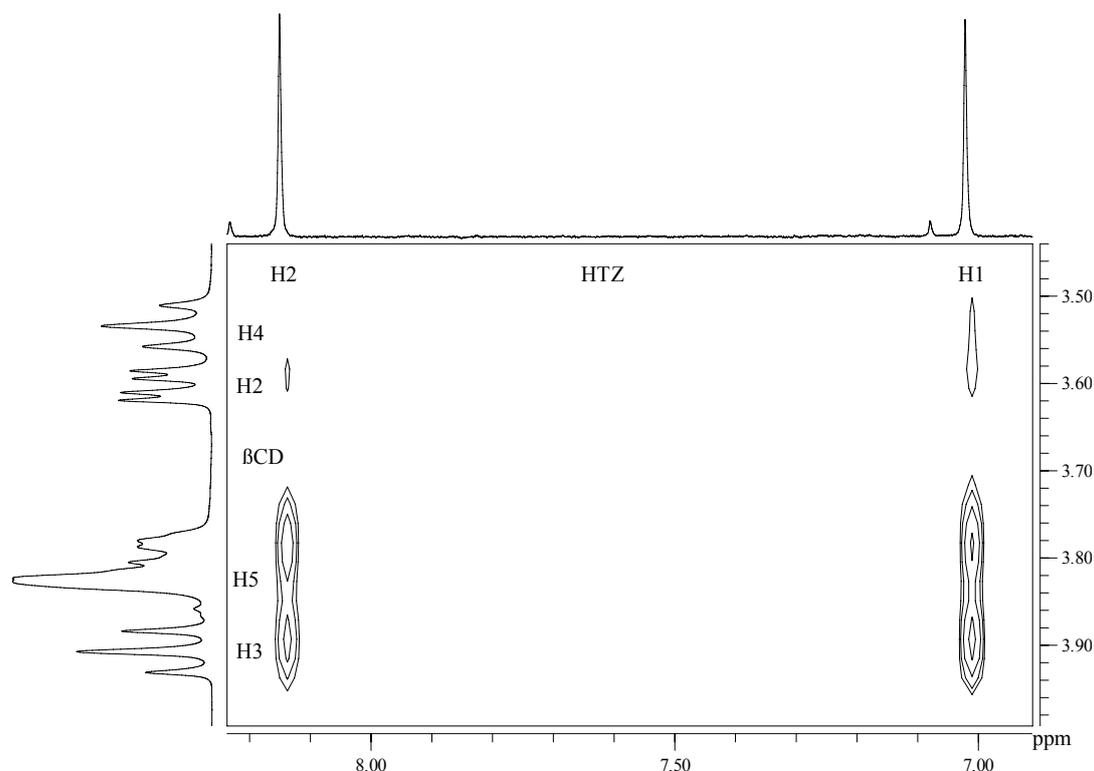


Comparison among HTZ, PM and the HTZ: $\beta$ -CD complexes shows a loss of resolution in the typical HTZ bands observed at  $\bar{\nu}$  3300  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  1264  $\text{cm}^{-1}$  and  $\bar{\nu}$  721  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to N-H<sub>2</sub>,

SO<sub>2</sub> and N-H bonds, respectively [17]. These results could be due to the host:guest interaction between the HTZ aromatic moiety and the β-CD cavity. Disappearance of the O-H deformation band ( $\delta_{OH}$ ,  $\nu$  1640 cm<sup>-1</sup>) of water molecules in the β-CD cavity can be observed in the spectra of the PM and inclusion compounds. This fact may suggest complex formation by water loss of CD cavity and subsequent HTZ inclusion [18]. It can also be observed that the inclusion compounds' spectra are very similar to each other, implying the three techniques used to obtain HTZ:β-CD are suitable to provide inclusion complexes.

In order to confirm the interactions between HTZ:β-CD observed by FTIR, NMR spectroscopy technique was also used. NMR spectroscopy of an inclusion compound between HTZ and β-CD has been previously described in the literature [19]. <sup>1</sup>H-NMR spectra obtained for HTZ:β-CD demonstrated that there are correlations between HTZ and β-CD in complexes prepared by SD, FDY and FB. As shown in Figure 3, correlations occur among the H3, H5 and H6 of β-CD and the aromatic hydrogens H1 and H2 of HTZ in the complex prepared by FB. Further correlations can also be observed among H1 and H2 of HTZ and H2 and H4 of β-CD in the same complex, confirming the formation of the inclusion compound. Similar correlations to those observed for the complex obtained by FB were observed for the SD and FDY complexes.

**Figure 3.** Partial contour map 2D-ROESY in D<sub>2</sub>O at 400MHz for HTZ:βCD prepared by the fluid bed (FB) technique.

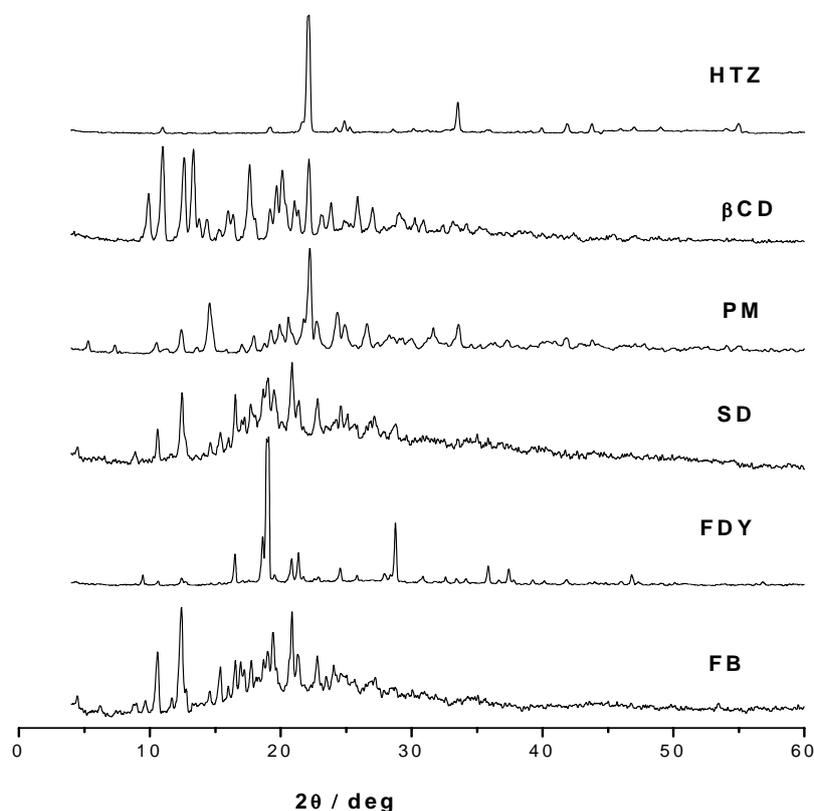


Powder X-ray diffraction patterns of HTZ, β-CD, PM and three complexes are shown in Figure 4. It is well described in the state-of-the-art that the differences in the solid phases are responsible for the differences in drug's solubility [20]. For example, an amorphous material is more reactive than a

crystalline one due to its higher thermodynamic activity, and as consequence amorphous materials are considered more hygroscopic when compared to crystalline solids [20,21].

Thus, the XRD pattern diffraction studies are very useful in order to determine these properties; they do not provide, however, strong evidence of the formation of inclusion complexes. Analyzing the XRD pattern diffraction one can observe a semi-crystalline profile for the SD and FB inclusion complexes in contrast to crystalline XRD patterns diffraction the HTZ,  $\beta$ -CD, PM and FDY complexes. These results are in accordance to the higher solubility observed for these SD and FB complexes in comparison with the FDY complex since crystallinity and amorphicity are important factors that must be related to compounds' solubility [20,21]. However, they are useful to monitor the compounds' crystallinity changes upon host-guest interaction.

**Figure 4.** XRD diffractogram of HTZ,  $\beta$ -CD, physical mixture (PM) and the complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY), fluid bed (FB) methods.



Evidence of inclusion complex formation was obtained from thermal analysis. TG curves and their first derivative (DTG curves) of HTZ,  $\beta$ -CD, PM and the three inclusion complexes are shown in Figure 5. The HTZ curve presented a stable profile until about 290 °C, after which a weight loss of 50% was observed, suggesting an associated compound through hydrogen-hydrogen bonding interaction in the solid state. The  $\beta$ -CD TG curve showed two thermal events – one around 100 °C with 15% of mass loss, and the second in the range of 300-350 °C. These two thermal decomposition processes are in accordance with the literature [22] and could be associated to the loss of water molecules from the cyclodextrin cavity and the complete thermodecomposition of the  $\beta$ -CD,

respectively. The PM curve showed a weight loss of 15% at about 70 °C, related with water loss from the cyclodextrin cavity, the same observed in the  $\beta$ -CD curve.

Similar thermal decomposition profiles for the three HTZ: $\beta$ -CD inclusion compounds were observed, where one can find two thermal events, one a 40-70 °C and the second from 260-270 °C; these events are associated to the loss of water and the thermal decomposition of the HTZ: $\beta$ -CD complexes. It is interesting to note that these last TG profiles are very similar to those of the physical mixture, suggesting a limitation of the technique in this case, to monitor and distinguish an inclusion compound from a physical mixture.

**Figure 5.** TG/DTG curves for HTZ,  $\beta$ -CD, physical mixture (PM) and the complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB).

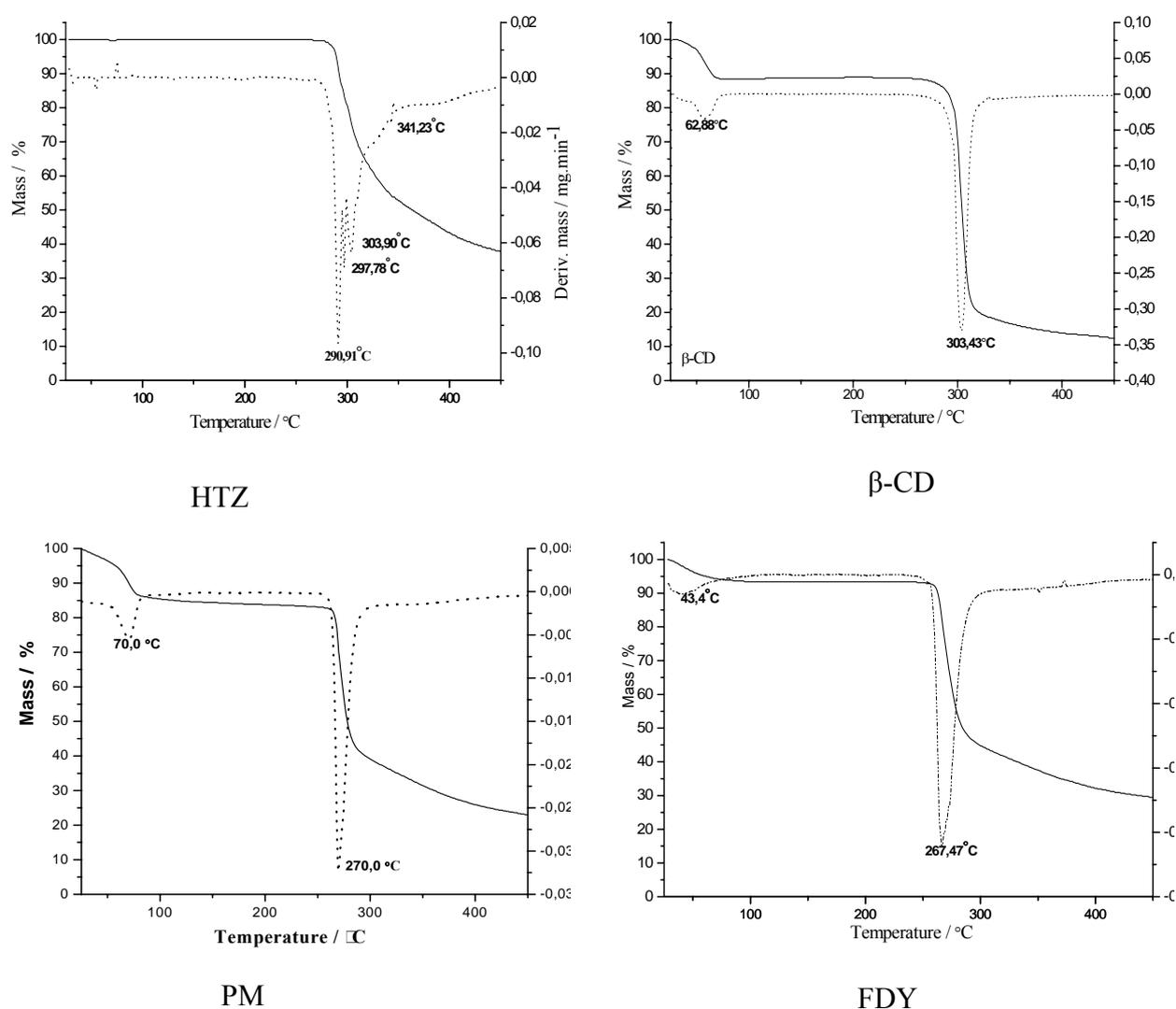


Figure 5. Cont.

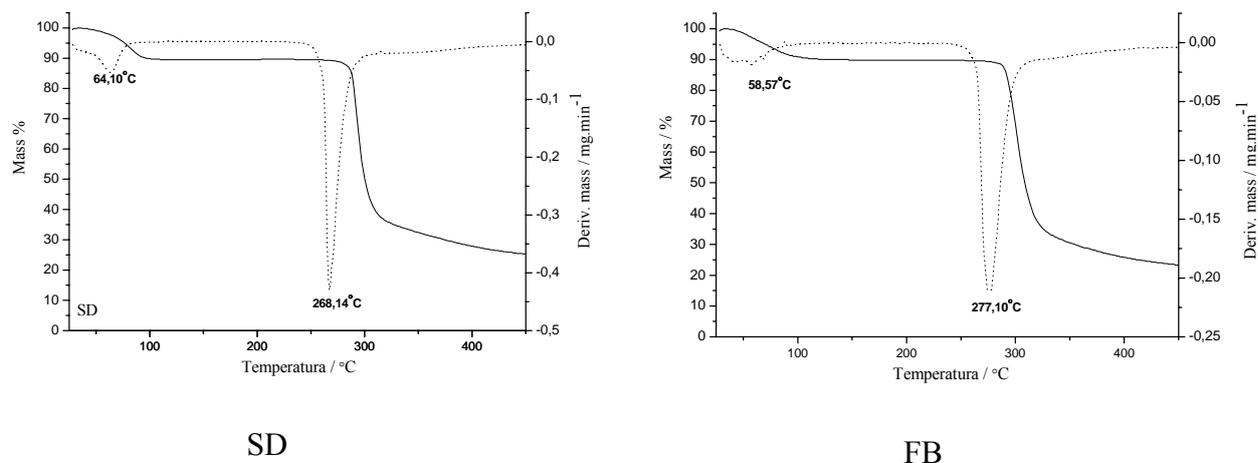
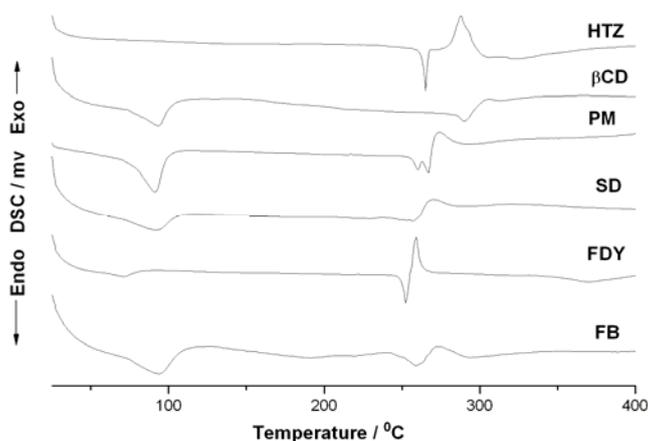


Figure 6 shows the DSC curves of  $\beta$ -CD, HTZ and for the three inclusion compounds. The DSC curve for HTZ presented two thermal events, one at about 270 °C and the second in 340 °C, that could be associated to the HTZ melting point and thermal decomposition, respectively [23]. Analyzing the  $\beta$ -CD DSC curve one can observe two endothermic peaks, one at 100 °C and the second around 300 °C. These events could be associated to the loss of water of  $\beta$ -cyclodextrin and the  $\beta$ -CD melting with decomposition, respectively. The PM DSC curve shows a typical profile for the thermal decomposition of a mixture where the individual phenomena of HTZ and  $\beta$ -CD are observed. Changes in the FB and SD's DSC curves in comparison to HTZ,  $\beta$ -CD and PM were observed. The FB and SD's DSC curves did not show the HTZ melting point at 270 °C, suggesting a host-guest interaction in both cases. Interestingly, the FDY's DSC curve showed only a reduction of the HTZ melting point around 250 °C, suggesting the presence of a mixture between the inclusion compound and the physical mixtures in this case.

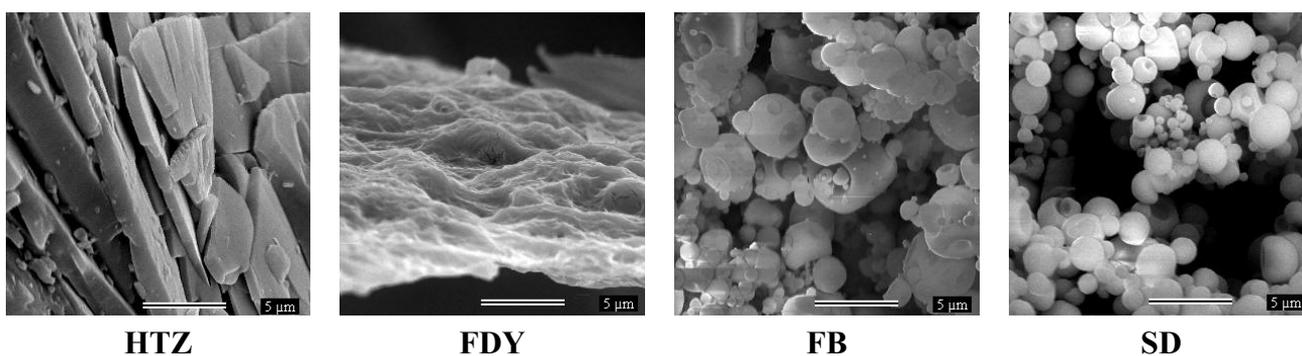
**Figure 6.** DSC curves for HTZ,  $\beta$ -CD, physical mixture (PM) and the complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB).



Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed for the raw materials and for SDY, FB and SD particles in order to investigate the morphology modification and the results are depicted in Figure 7. It

could be observed that HTZ presented large and irregular crystals. Freeze-dried complex (SDY) showed a more amorphous solid with some porosity. In contrast, the FB and SD solid showed spherical particles with heterogenous size and also some surface porosity. However, the particles obtained by the FB technique did not present uniform size unlike what was observed for particles formed by SD. These results are in accordance with the literature where is described that the speed and drying time of the SD and FB techniques, could modify the morphology of the compounds obtained by these methods [21].

**Figure 7.** Photomicrographs of HTZ, and the complexes prepared by freeze-drying (FDY), fluid bed (FB) and spray drying (SD) methods, magnification 5000 $\times$ .



Size distributions for HTZ and inclusion complexes are shown on Figure 8. Distribution curves suggested that HTZ (Figure 8A) has a unimodal particle distribution, presenting 90% of particle size below 27  $\mu\text{m}$ . Higher HTZ particle size distribution it was observed in comparison with the respectively complexes particle size. SDY complex (Figure 8B) presented 90% of particle size below 32  $\mu\text{m}$ . Besides, the SD and FB complexes (Figures 8C and 8D, respectively) have two particle size populations. In addition when the particle size distribution of the SD and FB complexes are analyzed one can observe that complexes show 90% of particles size below 17  $\mu\text{m}$  and 32  $\mu\text{m}$ , respectively (Figures 8C and 8D).

**Figure 8.** Particule size distribution, by number of particle, of the HTZ (A) and complexes prepared by freeze-drying (B), spray drying (C) and fluid bed (D).

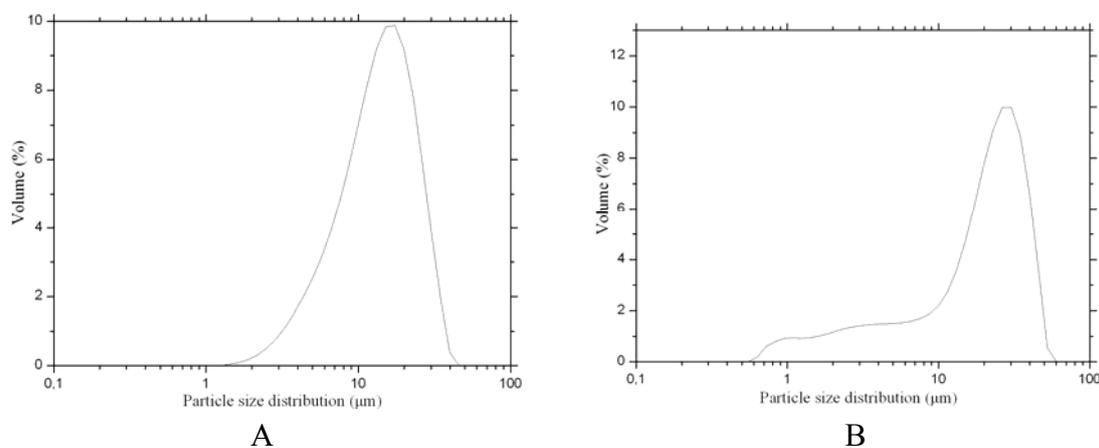
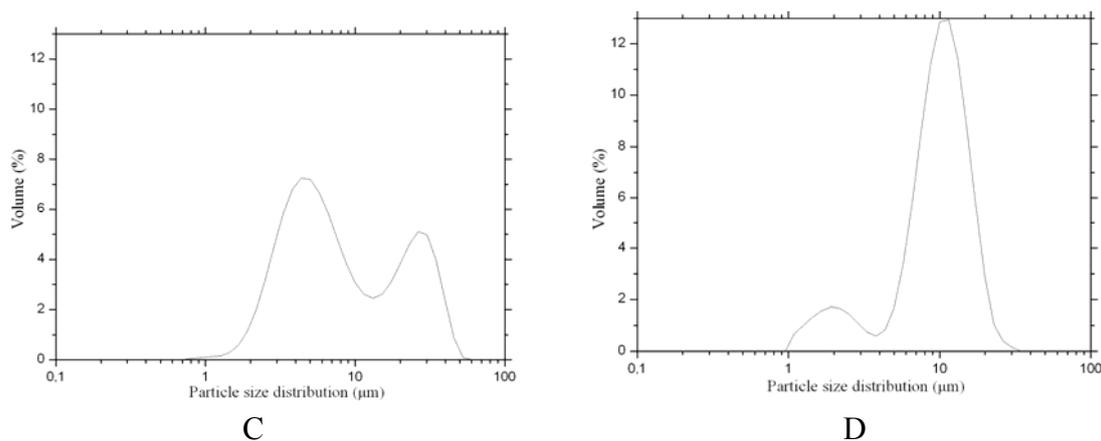


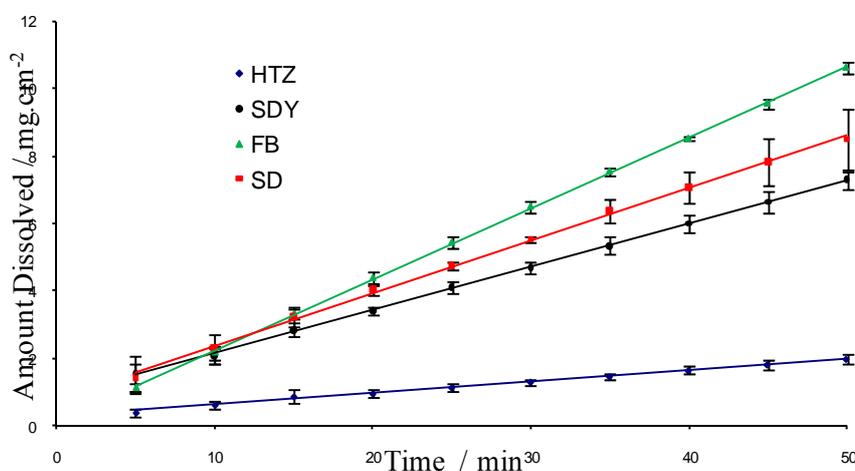
Figure 8. Cont.



Dissolution studies are among of the most important *in vitro* tests during pre-formulation studies. They provide information about improvements in the bioavailability of drugs promoted by inclusion complexes. This trial do not only demonstrates the intrinsic solubility increments achieved by drug encapsulation but also allows the evaluation of the kinetics of drug release [24]. When applying the rotating disc method, the dissolution rate expression must be applied assuming laminar convective flow conditions and constant surface area, which is generally expressed as milligrams dissolved per minute per centimeter squared [25].

The dissolution profiles of HTZ alone and the three complexes in simulated gastric fluid (pH 1.2) are shown in Figure 9. Dissolution parameters, expressed as percent dissolved drug, and dissolution efficiency values at different times are presented in Table 1. The data were normalized to percentage of released HTZ versus time. Linearity was higher than 0.99 (Table 1) and the calculated intrinsic dissolution showed a Relative Standard Deviation (RSD) below 2% for HTZ and complexes, indicating acceptable reproducibility.

**Figure 9.** Intrinsic dissolution profiles for HTZ and complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB).



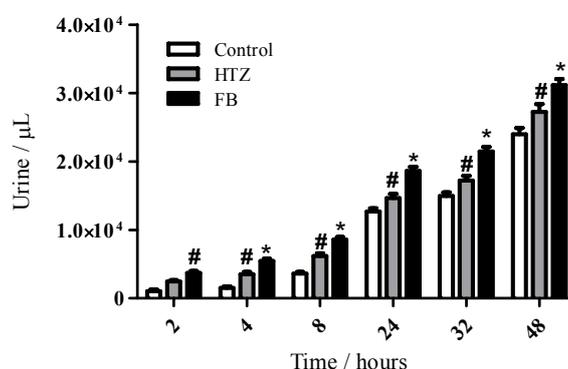
**Table 1.** Linear regression, linearity and intrinsic dissolution for HTZ and complexes prepared by spray drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB).

	Linear Equation	Linearity	Intrinsic Dissolution Efficiency ( $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
<b>HTZ</b>	$Y = 0.0345x + 0.2718$	0.9960	$0.040 \pm 0.003$
<b>SD</b>	$Y = 0.1571x + 0.7908$	0.9986	$0.170 \pm 0.018$
<b>FDY</b>	$Y = 0.1287x + 0.8545$	0.9996	$0.146 \pm 0.005$
<b>FB</b>	$Y = 0.2109x + 0.1278$	0.9998	$0.213 \pm 0.004$

FB, SD and FDY exhibited dissolution rates up to 5.3, 4.3 and 2.4 times higher in comparison to the dissolution rate of HTZ. It is interesting to note that the observed higher dissolution rate for the FB and SD inclusion complexes could be due to the crystalline size and morphology of these compounds as discussed above, as one could obtain similar inclusion complexes with different crystalline profiles by different preparation methods. Powder granulometry and particle morphology of a compound are key factors for its dissolution rate [20]. Based on these results, one can suggest that the inclusion process has a key role in increasing the solubility of HTZ.

Based on the physico-chemical characterization of the HTZ: $\beta$ -CD inclusion compound by three different methods and their intrinsic dissolution profile we choose the FB HTZ: $\beta$ -CD complex as a most interesting complexes in order to make the biological diuretic evaluation. It is interesting to mention that the quantification of ions such as sodium and chloride in urine is one of the best methods to determine the diuretic effect of drugs [6,7]. Results on the cumulative volumes of excreted urine after oral administration of the compounds are shown on Figure 10.

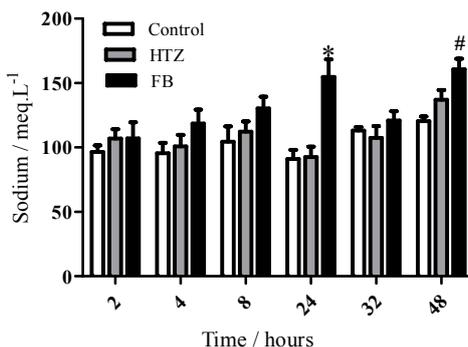
**Figure 10.** Time-course of urine output in Wistar rats treated with distilled water (control), HTZ and FB. The volume of excreted urine was measured at 2, 4, 8, 24, 32 and 48 h after the after oral administration of the compounds; cumulative values are reported as mean  $\pm$  S.E.M for twelve rats in each group. # statistically different from control group and \* statistically different from control and HTZ groups,  $p < 0.05$ .



A statistically different diuretic effect of HZT was observed after 4 hours in comparison to control and this effect was maintained until 48 hours. On the other hand, FB presented this effect from 2 hours after compound administration. In addition, the diuretic effect of FB was significantly different in comparison to HTZ and control between 4 and 48 hours. Figure 11 shows cumulative sodium values in excreted urine. Data showed a statistically different increase of the amounts of electrolyte in the FB

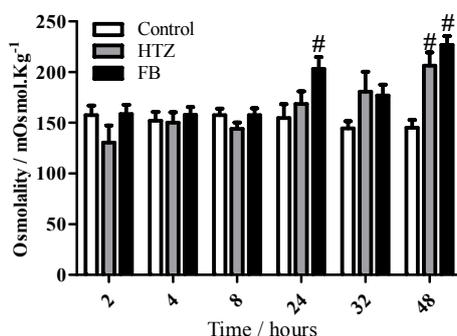
group in comparison to the HTZ and control groups 24 hours after administration. This effect was also observed for FB in comparison to control after 48 hours.

**Figure 11.** Time-course of excreted sodium in urine in Wistar rats treated with distilled water (control), HTZ and FB. The volume of excreted urine was measured at 2, 4, 8, 24, 32 and 48 h after oral administration of the compounds; cumulative values are reported as mean  $\pm$  S.E.M for twelve rats in each group. # statistically different from control group and \* statistically different from control and HTZ groups,  $p < 0.05$ .



Finally, osmolality values shown in Figure 12 are in accordance to sodium output values, since statistically significant differences were observed for HTZ (48 hours) and FB (24 and 48 hours) in comparison to control group.

**Figure 12.** Time-course of urine osmolality in Wistar rats treated with distilled water (control), HTZ and FB. The volume of excreted urine was measured at 2, 4, 8, 24, 32 and 48 h after oral administration of the compounds; cumulative values are reported as mean  $\pm$  S.E.M for twelve rats in each group. # statistically different from control group,  $p < 0.05$ .



Diuretic activities data of free HZT or associated to cyclodextrin suggested that CD increased the pharmacological effect of the drug in a time-course, considering equimolar dosis. This can be related to an increased solubility promoted by the FB formulation. Increased solubility profiles of cyclodextrin-containing formulations were previously reported in the literature for many drugs [3,9], including diuretics such as spironolactone [26]. Solubility is a crucial characteristic for increasing the bioavailability of drugs according to the BCS [27]. Therefore it was suggested that cyclodextrins and

their inclusion compounds play an important role in the improvement of the bioavailability of low-solubility drugs such as HTZ, based on an increase of drug solubility and, probably, higher permeability. However the present work did not deal with the permeation experiments using cell models and this aspect will be developed in future studies.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

HTZ ( $M_w = 297.74$ ) was purchased from Ausun Chemical Co. Ltd and  $\beta$ -CD ( $M_w = \sim 1135.01$ ) was purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and used as received. All other chemicals and solvents were of pharmaceutical or analytical reagent grade. The water was ultrafiltered by Milli-Q plus equipment from Millipore<sup>®</sup> (Billerica, MA, USA).

#### 3.2. Preparation of Inclusion Complexes

HTZ: $\beta$ -CD inclusion complexes were prepared assuming a 1:1 stoichiometry and made using three different methods: spray-drying (SD), freeze-drying (FDY) and fluid bed (FB). The batches of SD, FDY and FB complexes gave 70, 90 and 60% yields, respectively.

##### 3.2.1. Freeze-Drying

HTZ ( $0.25\text{g}$ ,  $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $\beta$ -CD ( $1.12\text{ g}$ ,  $0.98\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added separately in water (1 L) and submitted to heating ( $40\text{ }^\circ\text{C}$ ) with stirring until total dissolution. Subsequently, both solutions were stirred together for 4 hours. Resulting solution was frozen in liquid nitrogen and lyophilized (Savant Modulyo D-Freeze Dryer, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) for 72 hours. The obtained powder was stored at  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

##### 3.2.2. Spray-Drying

A Büchi model B290 laboratory-scale *spray-drier* was used. Solutions of HTZ and  $\beta$ -CD were obtained as described in the freeze-drying procedure. The mixture of both solutions was stirred for 4 hr and the obtained solution was subsequently atomized. The following conditions were used: airflow rate  $30\text{ m}^3/\text{h}$ , atomizing air pressure 1.0 Bar; inlet temperature  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , corresponding to an out temperature  $40\text{ }^\circ\text{C}$  and flow rate of the solution  $17\text{ mL}/\text{min}$ .

##### 3.2.3. Fluid Bed

A Mini Glatt *fluid bed* coater (Wurster insert, Glatt GmbH, Binzen, Germany) was used [21,28]. The solution containing a HTZ: $\beta$ -CD (1:1) mixture was introduced into the fluid bed. The detailed operating conditions were as follows: inlet air temperature.  $150\text{ }^\circ\text{C}$ ; product temperature  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; air flow rate  $-30\text{ m}^3/\text{h}$ ; rate spray  $30\text{ mL}/\text{min}$ ; atomizing air pressure 1.5 bar; spray nozzle diameter 0.5 mm.

### 3.3. Fourier Transform-Infrared (FTIR) Spectroscopy

Infrared spectra covering the range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  were obtained with a Spectrum One FTIR spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The spectra were an average of 32 scans at resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR spectra were obtained and recorded on a DRX-400 Avance – 400 MHz spectrometer (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Germany) at 300K.  $\text{D}_2\text{O}$  was purchased from Aldrich and used as solvent, whose isotopic purity was at least 99.9% and tetramethylsilane (TMS) as internal standard ( $\delta$  0.0). The solutions were transferred to NMR tube with 8 inches in length and 5 mm in external diameter. One-dimensional NMR experiments ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) were performed with 5 mm dual probe ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) using inverse detection with z-gradient coil. The intermolecular interaction between  $\beta$ -CD and HTZ was monitored by  $^1\text{H}$ -NMR and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  rotating-frame nuclear Overhauser spectroscopy, 2D-ROESY (500 ms spin lock). The water suppression was performed using the WATERGATE technique [29–31]. Data were processed using the software XWIN NMR, 3.1 (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Germany) and edited with Mestre C<sup>®</sup>, version 4.9.9.6.

### 3.5. Powder X-Ray Diffraction

X-Ray powder diffraction patterns were recorded at room temperature using a Rigaku Geigerflex 2037 from Rigaku Corp. (Tokyo, Japan). The measurement conditions were as follows: Co-filtered, Cu  $K\alpha$  radiation, scanning speed of 40 per min over a  $2\theta$  range of  $4^\circ$  to  $60^\circ$ .

### 3.6. Thermal Analysis

Thermogravimetric analysis (TG) and Derivative Thermogravimetric analysis (DTG) analyses were performed on a Mettler TGA- SDTA 851 Star<sup>e</sup> system (Mettler Toledo, Switzerland). Samples of about 4–6 mg were accurately weighed in open alumina pans and scanned from 25  $^\circ\text{C}$  to 450  $^\circ\text{C}$ , using a 2  $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  heating rate, under nitrogen atmosphere (50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). The instrument was calibrated with aluminum and indium as standards.

Differential Scanning Calorimetry (DSC) curves were produced in triplicate in a DSC Mettler 822 Star<sup>e</sup> system (Mettler Toledo, Switzerland) using the following conditions: dynamic nitrogen atmosphere (50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), heating rate of 2  $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Samples of about 2–3 mg were weighed out accurately and submitted to further heat scanning from 25  $^\circ\text{C}$  to 450  $^\circ\text{C}$  in a sealed aluminum pan with a capacity of 40  $\mu\text{L}$ . An empty sealed aluminum pan was used as reference. The equipment was periodically calibrated with indium (99.98%, m.p. 156.65  $^\circ\text{C}$ , Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA).

### 3.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface morphology of pure components and their equimolar binary systems obtained by different methods were examined by means of a JEOL (JSM 840 A, 4–10 Kv model) scanning electron microscope. The powders were previously fixed on a brass stub using double-sided adhesive tape and

then were made electrically conductive by coating, in a vacuum, with a thin layer of gold (100-300 Å), for 240 s. Photographs were taken at an excitation voltage of 10 Kv and appropriate magnifications.

### 3.8. Particle Size Analysis

The ground mixture was dispersed in vegetable oil and the suspension was sonicated for 5 min. The particle size distributions were determined by the laser diffraction technique with a Malvern Mastersizer 2000 instrument (Malvern Instruments, United Kingdom).

### 3.9. Intrinsic Dissolution

The dissolution studies were conducted under sink conditions in HCl solution ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 900 mL) at  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  and rotational speeds of 100 rpm. Each dissolution test was performed at least in quadruplicate [25]. The dissolution system was fitted with a ERWEKA DT800 (Distek Inc., NJ, USA) and a HP 89092A 7-channel peristaltic pump (Agilent Technologies Italia Spa., Roma, Italy). The collected aliquots containing HTZ were filtered using a  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  filter (Millipore®), and analyzed in a spectrophotometer at 270 nm.

Discs with FDY, SD, FB complexes and HTZ were prepared compressing powder (200.0 mg) in a Perkin Elmer hydraulic press (Waltham, Massachusetts, USA) for 1 min under 3.5 t compression force, using a 8 mm punch. The surface area exposed was  $0.5 \text{ cm}^2$  and the disk distance from vessel bottom was 2.54 cm. Aliquots of HTZ from the mixtures prepared by the FDY, SD, FB methods were automatically collected every 5 minutes until 50 minutes. The results were normalized to the percentage of HTZ released, a linear regression of HTZ released versus time was plotted and the intrinsic dissolution rate of the drug was determined in mg per minute per  $\text{cm}^2$  from the slope of the regression line calculated. Only the linear portion of each dissolution profile was considered for the intrinsic dissolution rate determination. The slope and the other statistical parameters of the curves were calculated by linear regression analysis.

### 3.10. Evaluation of the Activity Diuretic of HTZ and FB Complex

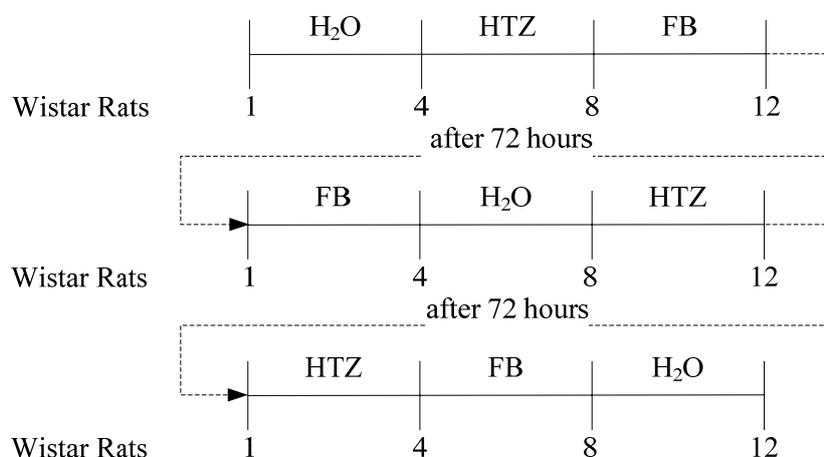
Male Wistar rats (300-350 g) were obtained from the animal facilities of ICB (CEBIO), UFMG. The rats were housed individually in metabolic cages, controlled conditions of temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and a 12:12 h light/dark cycle. Studies were performed in accordance with the guidelines for the human use of laboratory animals of our institution and approved by local authorities.

Diuretic efficacies *in vivo* of HTZ and FB were evaluated in comparison to control. After 48 hr adaptation/acclimatization in a metabolic cage, the animals were randomized in three experimental groups: control ( $n = 4$ ), a HTZ ( $n = 4$ ) and a FB ( $n = 4$ ) one. Suspensions of HTZ and FB were prepared in distilled water and administered to animals by gavage performing doses of  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight (HTZ) and  $38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight (FB, equivalent to  $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  of HTZ) [32,33]. Distilled water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) was used as control.

The three groups of rats were allocated to one of three different treatments as summarized in Figure 13. The period of cumulative urine output was recorded at 2, 4, 8, 24, 32, and 48 hr after oral administration of compounds. The urine volume was measured and a urine sample was taken for

further analysis. Urinary sodium was determined in a flame photometer (CELM FC-180, Belo Horizonte/MG, Brazil). Osmolality were measured in a osmometer (MicroOsmette, Natick, MA, USA) Results were presented as mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of mean) and were analysed by two-way analysis of variance followed by Boferroni *post hoc* test when the main effect was significant. A  $p < 0.05$  was considered significant.

**Figure 13.** Study scheme. The wistar rats were randomized in three experimental groups with four rats each one. Oral administration by gavage: 1 mL of distilled water (control); HTZ ( $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  body weight) and FB ( $38 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  body weight). Inversion of groups occurred 72 hours after administration.



#### 4. Conclusions

Based on the results one can conclude that all the three methods proposed in this work are efficient for obtaining HTZ: $\beta$ -CD inclusion compounds, but it is interesting to note that among them the most promissory method is the fluid bed one. This method could be easily used for the pharmaceutical industrial production of inclusion complexes using cyclodextrins.

Higher intrinsic dissolution of the inclusion compounds in comparison to the free HTZ was also demonstrated. Better diuretic activity for the HTZ included in cyclodextrin was obtained by the fluid bed method in comparison with the free HTZ, a result that could be due to the higher water intrinsic dissolution and changes in the crystalline size and morphology introduced by the cyclodextrin on the host:guest were interesting.

Enhanced pharmacological effect of HTZ in the FB formulation can be related to an improvement on oral bioavailability, as a consequence of the increased solubility, which makes the CDs important pharmaceutical excipients.

#### Acknowledgments

The authors are very grateful to the Brazilian research support agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), INCT (Nacional Institute of Science and Technology), FUNED (Fundação Ezequiel Dias) the support technical of

Pharmaceutical Development Department and the NANO-BIOFAR (CNPq/INCT/FAPEMIG) for the financial support for this work.

## References

1. Zappe, D.; Papst, C.C.; Ferbe, P. Randomized study to compare valsartan  $\pm$  HCTZ versus amlodipine  $\pm$  HCTZ strategies to maximize blood pressure control. *Vas. Health Risk Manag.* **2009**, *5*, 883-892.
2. Ladak, N.; Thompson, J. Drugs acting on the heart: Antihypertensive drugs. *Anaesth. Intensive Care Med.* **2009**, *10*, 392-395.
3. Jensen, C.E.; Santos, R.A.S.; Denadai, A.M.L.; Santos, C.F.F.; Braga, A.N.G.; Sinisterra, D.S. Pharmaceutical composition of valsartan: $\beta$ -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. *Molecules* **2010**, *15*, 4067-4084.
4. Mahmud, A.; Feely, J. Low-dose quadruple antihypertensive combination more efficacious than individual agents – a preliminary report. *Hypertension* **2007**, *49*, 272-275.
5. Hoes, A.W.; Grobbee, D.E.; Peet, T.M.; Lubsen, J. Do non-potassium-sparing diuretics increase the risk of sudden cardiac death in hypertensive patients? Recent evidence. *Drugs* **1994**, *47*, 711-733.
6. Opie, L.H.; Kaplan, N.M. Diuretics. In *Drugs for the Heart*, 3rd ed.; Opie, L.H., Ed.; W.B. Saunders Co.: Philadelphia, PA, USA, 1991; pp. 74-99.
7. Field, M.J.; Stanton, B.A.; Giebisch, G.H. Differential acute effects of aldosterone, dexamethasone and hyperkalemia on distal tubular potassium secretion in the rat kidney. *J. Clin. Invest.* **1984**, *74*, 1792-1802.
8. Loftsson, T. Cyclodextrins and the biopharmaceutics classification system of Drugs. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2002**, *44*, 63-67.
9. Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1-11.
10. Brewster, M.E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 645-666.
11. Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
12. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2005**, *6*, E329-E357.
13. Martin Del Valle, E.M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.
14. Nalluri, B.N.; Chowdary, K.P.R.; Murthy, K.V.R.; Becket, G.; Crooks, P.A. Tablet formulation studies on nimesulide and meloxicam-cyclodextrin binary systems. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2007**, *8*, E1-E7.
15. Denadai, A.M.L.; Santoro, M.M.; Silva, L.H.; Viana, A.T.; Santos, R.A.S.; Sinisterra, R.D. Self-assembly characterization of the  $\beta$ -cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *55*, 41-49.

16. Davis, M.E.; Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
17. Acecves-Hernandez, J.M.; Agacino-Valdés, E.; Paz, M.; Hinojosa-Torres, J. Experimental and theoretical study of the conformational analysis of hydrochlorothiazide. *J. Mol. Struct.* **2006**, *786*, 1-8.
18. Sousa, F.B.; Denadai, A.M.L.; Lula, I.S.; Nascimento, C.S.; Fernandes, G.S.N.; Lima, A.C.; Almeida, W.B.; Sinisterra, R.D. Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: Thermodynamics and topological studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8426-8436.
19. Russell, N.R.; McNamara, M. FT-IR and Raman spectral evidence for metal complex formation with  $\beta$ -cyclodextrin as a first sphere ligand. *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* **1989**, *7*, 455-640.
20. Zhanga, G.G.Z.; Lawa, D.; Schmittb, E.A.; Qiub, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 371-390.
21. Zang, X.; Wu, D.; Lai, J.; Lu, Y.; Yin, Z.; Wu, W. Piroxicam/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating technique. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 665-675.
22. Kohata, S.; Kouki, J.; Akirsa, O. Thermal decomposition of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and modified  $\beta$ -CyD) and of metal-( $\beta$ -CyD) complexes in the solid phase. *Termochim. Acta.* **1993**, *217*, 187-198.
23. Menon, D.; El-Ries, M.; Alexander, K.S.; Riga, A.; Dollimore, D. A thermal analysis study of the decomposition of hydrochlorothiazide. *Instrum. Sci. Technol.* **2002**, *30*, 329-340.
24. Blagden, N.; de Matas, M.; Gavan, P.T.; York, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 617-630.
25. *The United States pharmacopeia*, 31st ed.; The United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2007; p. 1087.
26. Kaukonen, A.M.; Lennernas, H.; Mannerman, J.P. Water-soluble  $\beta$ -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: Preclinical evaluation of spironolactone bioavailability from solutions of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 611-619.
27. Amidon, G.L.; Lennernas, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. A Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413-420.
28. Lu, Y.; Zang, X.; Lai, J.; Yin, Z.; Wu, W. Physical characterization of meloxicam- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a fluid-bed method. *Particuology* **2009**, *7*, 1-8.
29. Schneider, H.J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755-1785.
30. Werner, M.H. *Advanced User's Guide, Bruker*. <940712>; Spectrospin A.G.: Fallanden, Switzerland, 1994.
31. Rahman, A. *One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*, 1st ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 1989.
32. Mougnot, N.; Médiani, O.; Lechat, P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 359-365.

33. Materson, B. Historical perspective of low- vs. high-dose diuretics. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2007**, *373-380*.

*Sample Availability:* Samples are not available.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).