

Universidade Federal De Minas Gerais  
Instituto De Ciências Exatas  
Departamento de Química

CARLOS EDUARDO DE MATOS JENSEN

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO BIOLÓGICO DE COMPOSTOS DE  
INCLUSÃO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT1 E ESTATINAS

Belo Horizonte  
2010

UFMG/ICEx/DQ.830<sup>a</sup>  
T.350<sup>a</sup>

CARLOS EDUARDO DE MATOS JENSEN

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO BIOLÓGICO DE COMPOSTOS DE  
INCLUSÃO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR AT1 E ESTATINAS

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

Belo Horizonte  
2010

Jensen, Carlos Eduardo de Matos

J545d      Preparação, caracterização e estudo biológico de  
2010      compostos de inclusão contendo antagonista do receptor  
T      AT1 e estatinas

xvi, 168 f. : il.

Orientador: Rubén Dário Sinisterra.

Co-orientador: Robson Augusto de Souza Santos.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

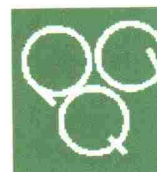
Bibliografia f. 133-144.

1. físico-química - Teses 2. Compostos de inclusão -  
Teses 3. Agentes hipotensores - Teses 4. Análise  
térmica - Teses      I. Sinisterra, Rubén Dário,  
Orientador II. Santos, Robson Augusto de Souza,  
Co-orientador III. Título

CDU 043  
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

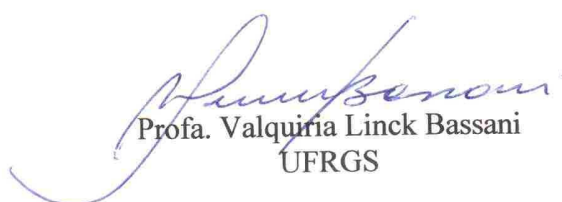


**"Preparação, Caracterização e Estudo Biológico de Compostos de Inclusão  
Contendo Antagonista do Receptor AT1 e Estatinas"**

**Carlos Eduardo de Matos Jensen**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

  
Profa. Valquíria Linck Bassani  
UFRGS

  
Dr. Washington Xavier de Paula  
Polícia Civil

  
Profa. Mônica Cristina de Oliveira  
UFMG

  
Profa. Rosemeire Brondi Alves  
UFMG

Belo Horizonte, 06 de agosto de 2010.

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

Agradeço primeiramente a Deus simplesmente pelo conforto de acreditar na sua existência e de que há sempre alguém olhando por nós;

À minha esposa Tatiana pelo apoio e que de tanto ler e reler partes deste trabalho o conhece algumas vezes mais do que eu;

Ao Professor Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán pela orientação deste trabalho com quem aprendi muito nesta caminhada;

Ao Professor Dr. Robson Augusto de Souza Santos pela co-orientação;

Aos professores do departamento de química da UFMG pela generosidade, sugestões e colaborações. Sem vocês não seria possível. Agradeço à Vâny Ferraz, Maria Irene Ioshida, Rosemeire Brondi e Vito Modesto;

Ao professor Lucas Antônio Miranda da Faculdade de Farmácia pela colaboração durante o exame de qualificação;

Aos amigos professores de todos os dias Eliana de Faria Garcia, Raquel Machado Santiago, Flaviane Francisco Hilário e Marcelo Antônio Oliveira. Só vocês conhecem as verdadeiras pedras. Obrigado por me ajudarem, não tenho como agradecer;

Ao Sr. José Augusto Alves Dupim, ex-coordenador do curso de farmácia do Centro Universitário Newton Paiva, pela compreensão e flexibilidade imprescindíveis para que eu assistisse às aulas do curso de pós-graduação em química;

Aos colegas de laboratório Anayive, Ivana, Michele, Joel, Ângelo, Washington, Alinne, Arlete, Frederico e Pedro;

À Cynthia Fernandes Ferreira Santos, Aline Nardone Gonçalves Braga e claro ao Zezé pelo auxílio no Laboratório de Hipertensão;

À minha co-orientadora extra-oficial para momentos difíceis, Sordaini Caligiorne. Eu admiro sua praticidade e raciocínio;

Aos amigos professores incentivadores de todas as horas, Elzília de Aguiar Nunan, Neuza Maria Magalhães, Lucia Helena de Angelis, Anderson Hollerbach Klier, Jacqueline Mégre Drumond, Sérgio Fernando de Oliveira Gomes, Luciane Abreu Ferreira e Yone de Almeida Nascimento;

Aos meus 1287 alunos que assistiram a minhas aulas nestes anos de doutorado, pela paciência com este professor;

Aos meus pais pela crença na minha capacidade;

À minha filha por ser fonte de força e de esperança.

## Resumo

O controle de hipertensão e a hipercolesterolemia são problemas de saúde crônicos e que ainda permanecem como um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil e também do mundo. Destaca-se neste contexto que a adesão ao tratamento é um dos maiores problemas enfrentados pelas equipes de saúde, ocorrendo muitas vezes complicação do quadro patológico em função do uso indevido dos medicamentos. A Organização Mundial de Saúde preconiza que uma das alternativas para contorno deste problema está relacionada à formulação dos medicamentos, sendo recomendado então que se intervenha tentando reduzir os efeitos adversos, minimizar as administrações e simplificar os regimes terapêuticos. Sendo assim há alternativas tecnológicas atualmente capazes de proporcionar estes ganhos destacando a utilização das ciclodextrinas como uma das possibilidades mais viáveis do ponto de vista econômico e técnico-científica. Dentre os fármacos empregados para tratamento da hipertensão destaca-se o valsartan, um potente inibidor dos receptores AT<sub>1</sub>, pertencente à classe biofarmacêutica II com biodisponibilidade reduzida em função de sua baixa solubilidade no trato gastrointestinal. Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do valsartan, foi utilizada a estratégia de preparação de complexos do tipo hóspede-hospedeiro, usando ciclodextrinas como hospedeiro, obtendo-se assim os compostos de inclusão. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, formados por seis, sete ou oito anéis de glicopirranose, compostas por uma cavidade hidrofóbica interna e uma superfície externa hidrofílica. Sua principal propriedade refere-se à capacidade de modificar a solubilidade e biodisponibilidade de substâncias. Na tentativa de aumentar a solubilidade do valsartan no trato gastrointestinal e conseqüentemente sua biodisponibilidade, foram preparados complexos por diferentes técnicas com objetivo de proporcionar inserção da molécula hóspede na cavidade interna da ciclodextrina. Os compostos de inclusão entre o valsartan e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) foram caracterizados no estado sólido por técnicas físico-químicas como análise térmica (TG/DTG e DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho e dissolução intrínseca. Os resultados obtidos demonstraram a formação de uma nova espécie supramolecular formada entre valsartan e a  $\beta$ -CD. Os compostos de inclusão também foram caracterizados em solução usando ressonância magnética nuclear (2D-ROESY) e diagramas de solubilidade. A partir dos resultados foi possível verificar a formação de uma nova espécie que teve constante de formação na faixa de 111,3 a 165,4 M<sup>-1</sup>, processo esse exotérmico indicando a formação de interações do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio. Baseado nos resultados de ressonância magnética nuclear determinou-se que a inclusão ocorreu pela inserção dos anéis aromáticos do valsartan na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Foram feitos testes anti-hipertensivos com ratos da linhagem SHR, naturalmente hipertensos, percebeu-se que comparativamente à administração do valsartan isolado, o complexo de inclusão proporcionou redução mais rápida da pressão arterial e prolongamento deste efeito por período superior a três dias. Já as estatinas empregadas para tratamento da hipercolesterolemia



também foram estudadas, sendo escolhidas a lovastatina e a sinvastatina como modelos. Estes fármacos têm biodisponibilidade reduzida e situada entre 10 e 20%. Na tentativa de elevar sua solubilidade e velocidade de dissolução as mesmas também foram complexadas à  $\beta$ -CD. Pelos estudos de solubilidade de fase percebeu-se a elevação da solubilidade das estatinas em meio aquoso, com constantes de formação distintas. Para a sinvastatina a constante de formação do complexo variou entre 2340,2 e 2552,1  $M^{-1}$ , sendo este processo de inclusão entalpicamente dirigido. Já a lovastatina também foi incluída na cavidade da  $\beta$ -CD onde as constantes de formação do complexo situaram-se entre 289,0 e 809,4  $M^{-1}$ . Para a lovastatina o processo de complexação foi caracterizado como endotérmico, havendo elevação da entropia, mas ainda assim com redução da energia livre do sistema. Diante de todas as técnicas de caracterização empregadas para avaliação destes dois últimos fármacos, pode-se perceber que a complexação não é um processo fácil de ser realizado devido à reduzida solubilidade destas substâncias em meio aquoso. Exatamente em função desta reduzida solubilidade o acomodamento molecular se torna mais restrito. Sendo assim, à medida que a solubilidade do fármaco cresce a chance de inclusão aumenta. Isto foi confirmado pela condução da técnica de liofilização para o valsartan. Todos esses dados e estudos indicam que os compostos de inclusão mostram-se como interessante alternativa tecnológica para liberação controlada de fármacos, podendo servir como base para a pré-formulação e produção de novos sistemas capazes de otimizar esquemas terapêuticos, reduzir efeitos colaterais e elevar a adesão dos pacientes aos tratamentos crônicos principalmente.

Palavras chave: composto de inclusão, valsartan, lovastatina, sinvastatina, 2D-ROESY RMN, FTIR, Análise térmica, solubilidade de fase, difração de raios-X de pó, dissolução intrínseca e avaliação da ação anti-hipertensiva.

---

## Abstract

Hypertension and hypercholesterolemia are chronic diseases and still remain one of the major public health problems in Brazil and in the world. In this context, adherence to treatment is one of the biggest problems which often cause medical complications due to incorrect use of medicines. The World Health Organization (WHO) recommends that an alternative to solve this problem is related to the formulation of drugs. WHO recommends the reduction of adverse effects, decreased number of administrations and simplification of treatment. Therefore, it is necessary to look for technological alternatives that can provide these gains and emphasizing the cyclodextrins as one of the most viable options for this. Considering the group of drugs used to hypertension treatment, valsartan, a potent inhibitor of AT1 receptors, is included in the class II of the biopharmaceutical classification system, having low bioavailability due to its reduced solubility in water. In order to improve the physico-chemical and biological properties of valsartan, inclusion complex were prepared with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides formed by six, seven or eight glucopyranose rings, composed of an internal hydrophobic cavity and a hydrophilic outer surface. Its main property refers to the ability of modifying the solubility and bioavailability of drugs. With the intention to increase the solubility of valsartan in the gastrointestinal tract and consequently its bioavailability. The complexes were prepared by different techniques in order to provide inclusion of guest molecule in the internal cavity of cyclodextrin. The inclusion complexes prepared between valsartan and  $\beta$ -CD were characterized by physico-chemical techniques such as thermal analysis (TG / DTG and DSC), Fourier Transform infrared spectroscopy and intrinsic dissolution. The results showed the formation of a new supramolecular compound prepared between valsartan and  $\beta$ -CD. The inclusion complexes were also characterized in solution using nuclear magnetic resonance (2D-ROESY) and solubility diagrams. From these results it was possible to observe the formation of a new specie with equilibrium constant in the range  $111.3 \text{ M}^{-1}$  and  $165.4 \text{ M}^{-1}$ . The complexation is an exothermic process indicating the formation of intermolecular bonding like van der Waals forces and hydrogen bonds. Based on the results of nuclear magnetic resonance it was determined that the inclusion occurred by insertion of the aromatic rings of valsartan in the hydrophobic cavity of cyclodextrin. In vivo studies it was observed that inclusion complex has provided more rapid decrease in arterial pressure and maintenance of this effect for four days. The other molecules studied were the statins used for treatment of hypercholesterolemia, being chosen lovastatin and simvastatin. These drugs are included in the class II of the biopharmaceutical classification system with low bioavailability, between 10 and 20%. In an attempt to increase the solubility and dissolution rate, the drugs were complexed with  $\beta$ -CD. The phase solubility studies revealed that the statins had their water solubility increased with different equilibrium constants. The results for simvastatin showed an equilibrium constant in the range  $2340.2 \text{ M}^{-1}$  e  $2552.1 \text{ M}^{-1}$  and for lovastatin between  $289.0 \text{ M}^{-1}$  e  $809.4 \text{ M}^{-1}$ . The simvastatin inclusion was

characterized as an enthalpy-driven process and for the lovastatin the complexation was an endothermic process. All systems showed a reduction in free energy. Analyzing all the results it's possible to infer that the efficacy of lovastatin and simvastatin complexation is not an easy process to be performed, due to the low solubility of these drugs in water. Exactly due to this low solubility, the insertion becomes more improbable. The solubility of the drug increases the chance of occurring inclusion. This was confirmed by conducting the freeze-drying process for valsartan complexation. All these data and studies indicate that the inclusion compounds seems to be an interesting technology for controlled release of drugs, serving as a basis for pre-formulation studies and production of new formulations, improving treatment schemes, reducing side effects and increasing the adherence to the therapy.

Key-words: inclusion complexes, valsartan, lovastatina, simvastatin, NMR 2D-ROESY, FTIR, thermal analysis, phase solubility, X-Ray, intrinsic dissolution and antihypertensive evaluation.

## Lista de Figuras

• Figura 1.1. Estrutura química de diferentes estatinas utilizadas como hipolipemiantes orais...	13
• Figura 1.2. Representação esquemática das ciclodextrinas (A) e do monômero de glicopirranose (B) .....	16
• Figura 1.3: Representação da dissociação do fármaco a partir do complexo com ciclodextrina e absorção do fármaco após dissociação.....	18
• Figura 3.1: VAL ou 3-metil-2-[pentanoil-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil] fenil] metil] amino]-ácido butanóico - (IUPAC) [número de registro: 137862-53-4].....	30
• Figura 3.2. Variação na porcentagem de valsartan ionizado e não ionizado em função do pH da solução aquosa. ....	31
• Figura 3.3. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima valsartan.....	34
• Figura 3.4. Perfil de absorvidade molar do valsartan na região de 200 nm a 300 nm em diferentes solventes. (O número de amostras foi igual a 3 para cada solvente).....	35
• Figura 3.5. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para o valsartan.....	36
• Figura 3.6. Curva TG e DTG para o valsartan obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	37
• Figura 3.7. Curva DSC para o valsartan obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	37
• Figura 3.8. Difratoograma de raios-X de pó do valsartan.....	39
• Figura 3.9. Seções do espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o valsartan nas temperaturas de 27°, 37°, 47°, 57°, 67°, 77°, 87°, 97° e 107°C.....	42
• Figura 3.10. SVT ou [8 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - oxo - oxan - 2 il) etil] - 3, 7- dimetil - 1, 2, 3, 7, 8, 8a – hexa hidronaftaleno - 1 - il] 2, 2 - dimetilbutanoato (IUPAC) [número de registro: 79902-63-9].....	48
• Figura 3.11. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima sinvastatina.....	51
• Figura 3.12. Perfil de absorvidade molar da sinvastatina na região de 200 nm a 300 nm em diferentes solventes. (O número de amostras foi igual a 3 para cada solvente).....	52
• Figura 3.13. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a sinvastatina.....	53
• Figura 3.14. Curva TG e DTG para a sinvastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	55
• Figura 3.15. Perfil da curva DSC para a sinvastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	55
• Figura 3.16. Difratoograma de raios-X de pó da sinvastatina.....	56
• Figura 3.17. LVT ou [8 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - oxo - oxan - 2 il) etil] - 3, 7- dimetil - 1, 2, 3, 7, 8, 8a – hexa hidronaftaleno - 1 - il] 2 – metilbutanoato (IUPAC) [número de registro: 75330-75-5].....	63

• Figura 3.18. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima lovastatina.....	66
• Figura 3.19. Perfil de absorvidade molar da lovastatina na região de 200nm a 300nm em diferentes solventes (n = 3 para cada solvente). .....	67
• Figura 3.20. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a lovastatina.....	68
• Figura 3.21. Curva TG e DTG para a lovastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	70
• Figura 3.22. Perfil da curva DSC para a lovastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	70
• Figura 3.23. Difratoograma de raios-X de pó da lovastatina.....	71
• Figura 4.1. Diagrama de relação de solubilidade de fase de complexos formados entre ciclodextrina e molécula hóspede (adaptado de MOSHER & THOMPSON, 2007).....	79
• Figura 4.2. Diagrama de solubilidade do valsartan em presença de β-ciclodextrina nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C. (O número de amostras foi igual a 3).....	80
• Figura 4.3. Correlação entre porcentagem do fármaco complexado a diferentes ciclodextrinas em função dos fatores diluição e constante de formação. (adaptado de MOSHER & THOMPSON, 2007).....	82
• Figura 4.4. Difratoograma de raios-X de pó para o valsartan (VAL), β-CD e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS), Pasta e liofilização (LIOF) e mistura física (MF).....	85
• Figura 4.5. Dissolução intrínseca para o valsartan (VAL) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF) (O número de amostras foi igual a 3).....	86
• Figura 4.6. Espectro de absorção na região do infravermelho para a β-ciclodextrina.....	87
• Figura 4.7. Comparação dos espectros absorção na região do infravermelho para β-ciclodextrina (β-CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS), pasta (Pasta) e liofilização (LIOF), e mistura física entre valsartan e β-CD (MF).....	88
• Figura 4.8. Possíveis sítios de interação do valsartan com a β-CD conforme resultados obtidos por espectroscopia de absorção no infravermelho.....	89
• Figura 4.9. A) Curvas TG para β-ciclodextrina (β-CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas TG para β-CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e β-CD (MF). Análises feitas sob atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> , vazão de 50 mL.min <sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min <sup>-1</sup> .....	91
• Figura 4.10. A) Curvas DTG para β-ciclodextrina (β-CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas DTG para β-CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e β-CD (MF).....	93

- Figura 4.11. A) Curvas DSC para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas DSC para  $\beta$ -CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e  $\beta$ -CD (MF). Análises feitas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ..... 94
- Figura 4.12. Monômero de glicopiranosose que compõe a  $\beta$ -CD..... 95
- Figura 4.13. Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz) para a  $\beta$ -CD..... 96
- Figura 4.14. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em  $\text{DMSO}-d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão LIOF, na temperatura de  $27^\circ\text{C}$  com tempo de mistura igual a 500mseg..... 97
- Figura 4.15. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em  $\text{DMSO}-d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão Pasta, na temperatura de  $27^\circ\text{C}$  com tempo de mistura igual a 500mseg..... 98
- Figura 4.16. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em  $\text{DMSO}-d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão DIS, na temperatura de  $27^\circ\text{C}$  com tempo de mistura igual a 500mseg..... 99
- Figura 4.17. Sítio de complexação entre o valsartan e a  $\beta$ -CD determinado por 2D-ROESY indicando a possível formação do complexo na razão molar 1:1..... 100
- Figura 4.18. Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos após administração oral de uma dose de VAL ( $1,14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (barras brancas) e composto de inclusão LIOF ( $4,22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (barras pretas). \* não há diferença significativa entre VAL e LIOF, \*\*não há diferença significativa e  $p>0,05$  na comparação com o período controle, \*\*\*  $p<0,0001$  comparando VAL e LIOF no mesmo dia (Student T Test não pareado)..... 102
- Figura 4.19. Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos após administração oral de uma dose de VAL ( $1,14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (linha vermelha) e composto de inclusão LIOF ( $4,22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (linha azul)..... 103
- Figura 4.20. A) Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos, no período claro (barra branca) e escuro (barra cinza), após administração oral de A) uma dose de VAL ( $1,14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) e B) LIOF ( $4,22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). \* não há diferença significativa em comparação com o período controle..... 104
- Figura 4.21: Diagrama de solubilidade da sinvastatina (A) e lovastatina (B) em presença de  $\beta$ -CD nas temperaturas de  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ . (O número de amostras foi igual a 3)..... 107
- Figura 4.22. Difrátograma de raios-X de pó para a sinvastatina (SVT),  $\beta$ -CD, mistura física (MF) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e Pasta..... 110
- Figura 4.23. Difrátograma de raios-X de pó para a lovastatina (LVT),  $\beta$ -CD, mistura física (MF) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e Pasta..... 111

- Figura 4.24. Comparação dos espectros Absorção na Região do Infravermelho para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), sinvastatina (SVT), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -CD (MF)..... 112
- Figura 4.25. Comparação dos espectros Absorção na Região do Infravermelho para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), lovastatina (LVT), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -CD (MF)..... 113
- Figura 4.26. Sítios de interação da  $\beta$ -CD com a sinvastatina (SVT) e lovastatina (LVT) conforme resultados obtidos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho..... 115
- Figura 4.27. Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 116
- Figura 4.28. Curvas DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 118
- Figura 4.29. Curvas DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 119
- Figura 4.30. Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 120
- Figura 4.31. Curvas DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 123
- Figura 4.32. Curvas DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF)..... 124
- Figura 4.33. Ampliação de parte do mapa de contornos 2D-ROESY obtido em  $\text{DMSO}-d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da sinvastatina preparado pela técnica de pasta, na temperatura de  $27^\circ\text{C}$  com tempo de mistura igual a 500mseg..... 125
- Figura 4.34. Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em  $\text{DMSO}-d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da sinvastatina preparado pela técnica

de dispersão sólida, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.....	126
• Figura 4.35: Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em DMSO- $d_6$ a 400 MHz para o composto de inclusão da lovastatina preparado pela técnica de pasta, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.....	127
• Figura 4.36: Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em DMSO- $d_6$ a 400 MHz para o composto de inclusão da lovastatina preparado pela técnica de dispersão sólida, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.....	128

#### Lista de Quadros

• Quadro 1.1. Sistema para Classificação Biofarmacêutica de Fármacos.....	10
---	----

#### Lista de Tabelas

• Tabela 1.1: Fármacos incorporados em formulações de liberação controlada ou prolongada.....	5
• Tabela 1.2: Propriedades físico-químicas de ciclodextrinas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; SZENTE et al., 1999).....	15
• Tabela 1.3: Comparação da solubilidade de ciclodextrinas em solventes hidrofílicos a 25°C (%p/v) (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; KIBBE, 2001; SZENTE et al., 1999).....	15
• Tabela 3.1. Solubilidade do valsartan em água nas temperaturas de 25°, 30° e 37°C.....	31
• Tabela 3.2. Valores de LOG P para o valsartan em pH 1,2 e 6,8.....	32
• Tabela 3.3. Resultados de CHN para o valsartan.....	33
• Tabela 3.4. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica do valsartan.....	34
• Tabela 3.5. Absortividade molar ( $\epsilon$ ) do valsartan em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta.....	35
• Tabela 3.6. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para o valsartan.....	36
• Tabela 3.7. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares (d) do valsartan.....	39
• Tabela 3.8. Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) a 107°C para o valsartan, correlações observadas no mapa de contornos COSY.....	41
• Tabela 3.9. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento (J) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para o valsartan a 107°C.....	44
• Tabela 3.10. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^{13}\text{C}$ em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para o valsartan e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC.....	45



• Tabela 3.11. Solubilidade da sinvastatina em água nas temperaturas de 25°, 30° e 37°C.....	48
• Tabela 3.12. Solubilidade da sinvastatina em diversos solventes (INDEX MERCK, 2000; MOFFAT, 2003).....	49
• Tabela 3.13. Resultados de CHN para a sinvastatina.....	50
• Tabela 3.14. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica da sinvastatina.....	51
• Tabela 3.15. Absortividade molar ( $\epsilon$ ) da sinvastatina em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta.....	52
• Tabela 3.16. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para a sinvastatina.....	54
• Tabela 3.17. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares ( $d$ ) da sinvastatina.....	56
• Tabela 3.18. Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a sinvastatina com correlações observadas no mapa de contornos COSY.....	60
• Tabela 3.19. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento ( $J$ ) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a sinvastatina. ....	61
• Tabela 3.20. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^{13}\text{C}$ em DMSO- $d_6$ (400 MHz) e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC para a sinvastatina.....	62
• Tabela 3.21. Solubilidade da lovastatina em água nas temperaturas de 25°, 30° e 37°C.....	63
• Tabela 3.22. Solubilidade da lovastatina em diversos solventes (BRENNER et. al, 1992; INDEX MERCK, 2000; SUN et al., 2005).....	64
• Tabela 3.23. Resultados de CHN para a lovastatina.....	65
• Tabela 3.24. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica da lovastatina.....	66
• Tabela 3.25. Absortividade molar ( $\epsilon$ ) da lovastatina em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta.....	67
• Tabela 3.26. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para a lovastatina.....	69
• Tabela 3.27. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares ( $d$ ) da lovastatina.....	71
• Tabela 3.28: Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a lovastatina com correlações observadas no mapa de contornos COSY.....	74
• Tabela 3.29. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento ( $J$ ) em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a lovastatina.....	75
• Tabela 3.30. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^{13}\text{C}$ em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a lovastatina e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC.....	76
•	

• Tabela 4.1. Parâmetros para a regressão linear do diagrama de solubilidade do valsartan em presença de $\beta$ -CD.....	81
• Tabela 4.2. Média dos parâmetros termodinâmicos para o complexo VAL: $\beta$ -CD preparados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.....	83
• Tabela 4.3. Regressão linear, coeficiente de correlação linear (R) e dissolução intrínseca para o valsartan e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF). .....	86
• Tabela 4.4. Principais bandas de absorção observadas no espectro infravermelho da $\beta$ -ciclodextrina.....	88
• Tabela 4.5. Eventos observados nas curvas TG obtidas para o valsartan, $\beta$ -CD, complexos e mistura física.....	92
• Tabela 4.6. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de $^1\text{H}$ em DMSO- $d_6$ (400 MHz) para a $\beta$ -CD.....	96
• Tabela 4.7: Parâmetros para a regressão linear do diagrama de solubilidade de fase da sinvastatina (SVT) e lovastatina (LVT) em presença de $\beta$ -CD.....	108
• Tabela 4.8. Constantes de formação de complexos de LVT e SVT com ciclodextrinas descritas.....	108
• Tabela 4.9. Média dos parâmetros termodinâmicos para os complexos SVT: $\beta$ -CD e LVT: $\beta$ -CD preparados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.....	109
• Tabela 4.10. Eventos observados nas curvas TG obtidas para a sinvastatina, $\beta$ -CD, complexos e mistura física.....	117
• Tabela 4.11. Eventos observados nas curvas TG obtidas para a lovastatina, $\beta$ -CD, complexos e mistura física.....	121

## Abreviações

$\delta$	Deslocamento químico
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
2D	Bi-dimensional
Ang II	Angiotensina II
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Fármacos
CD	Ciclodextrina
CGT	ciclodextrina glicosiltransferase
$C_{max}$	Concentração plasmática máxima
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DIS	Dispersão sólida
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DM- $\beta$ -CD	Dimetil- $\beta$ -ciclodextrina
DRX	Difratometria de raios-X de pó
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HDL	Colesterol de alta densidade
HMBC	Heteronuclear Overhauser Multiple Bond Correlation
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A redutase
HMQC	Heteronuclear Overhauser Multiple Quantum Correlation
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
iECA	Inibidor da Enzima conversora de angiotensina
$J$	Constante de acoplamento escalar
LDL	Colesterol de baixa densidade
LIOF	Liofilizado
LOG P	Logaritmo do coeficiente de partição o/a
LVT	Lovastatina
MF	Mistura física
mmHg	Milímetros de mercúrio
PVP	Polivinilpirrolidona
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
SVT	Sinvastatina
TG	Termogravimetria

TGI	Trato Gastrointestinal
TMS	Tetrametilsilano
TRG	Triglicérides
UV-VIS	Ultravioleta visível
VAL	Valsartan

## Sumário

Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1. Hipertensão arterial.....	2
1.2. Hipercolesterolemia.....	5
1.3. Propriedades físico-químicas dos fármacos e biodisponibilidade oral.....	7
1.4. Ciclodextrinas.....	14
Capítulo 2: Material e Métodos.....	19
2.1. Reagentes utilizados.....	20
2.2. Equipamentos.....	21
2.2.1. Análise Elementar.....	21
2.2.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	21
2.2.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível (UV-VIS).....	21
2.2.4. Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG) .....	21
2.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	21
2.2.6. Difratomia de raios-X de pó (DRX) .....	21
2.2.7. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C (RMN).....	22
2.2.8. Liofilização.....	22
2.2.9. Medidor de tamanho de partículas.....	22
2.2.10. Polarimetria.....	22
2.2.11. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	22
2.3. Metodologias.....	23
2.3.1. Solubilidade.....	23
2.3.2. Doseamento dos fármacos.....	23
2.3.2.1. Valsartan.....	23
2.3.2.2. Sinvastatina.....	23
2.3.2.3. Lovastatina.....	24
2.3.3. Coeficiente de partição octanol/água - LOG P.....	24
2.3.4. Metodologia para a determinação da absorvidade molar.....	25
2.3.5. Metodologia para solubilidade de fase para a interação fármaco/ $\beta$ -CD.....	25
2.3.6. Preparação dos complexos.....	26
2.3.6.1. Método da pasta.....	26
2.3.6.2. Método da dispersão sólida.....	26
2.3.6.3. Método da liofilização.....	26

2.3.6.4. Mistura física.....	27
2.3.7. Dissolução intrínseca.....	27
2.3.8. Ação antagonista do complexo VAL:β-CD no efeito pressor da angiotensina II utilizando o método de Telemetria. ....	28
Capítulo 3: Caracterização dos fármacos.....	29
3.1. Caracterização dos fármacos.....	30
3.1.1. Valsartan.....	30
3.1.1.1. Solubilidade e LOG P.....	30
3.1.1.2. Ponto de fusão.....	32
3.1.1.3. Análise elementar.....	33
3.1.1.4. Desvio da luz polarizada.....	33
3.1.1.5. Granulometria.....	33
3.1.1.6. Absortividade molar.....	34
3.1.1.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho .....	35
3.1.1.8. Análise térmica.....	36
3.1.1.9. Difratometria de raios-X em pó.....	38
3.1.1.10. Ressonância Magnética Nuclear.....	40
3.1.2. Sinvastatina.....	48
3.1.2.1. Solubilidade e LOG P.....	48
3.1.2.2. Ponto de fusão.....	49
3.1.2.3. Análise elementar.....	50
3.1.2.4. Desvio da luz polarizada.....	50
3.1.2.5. Granulometria.....	50
3.1.2.6. Absortividade molar.....	51
3.1.2.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho .....	53
3.1.2.8. Análise térmica.....	54
3.1.2.9. Difratometria de raios-X de pó.....	56
3.1.2.10. Ressonância Magnética Nuclear.....	57
3.1.3. Lovastatina.....	63
3.1.3.1. Solubilidade e LOG P.....	63
3.1.3.2. Ponto de fusão.....	65
3.1.3.3. Análise elementar.....	65
3.1.3.4. Desvio da luz polarizada.....	65
3.1.3.5. Granulometria.....	65
3.1.3.6. Absortividade molar.....	66

3.1.3.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho .....	68
3.1.3.8. Análise térmica.....	69
3.1.3.9. Difratomia de raios-X de pó.....	71
3.1.3.10. Ressonância Magnética Nuclear.....	72
Capítulo 4 - Caracterização dos Complexos.....	77
4. Caracterização dos complexos.....	78
4.1. Valsartan.....	78
4.1.1. Solubilidade Termodinâmica.....	78
4.1.2. Difratomia de raios-X.....	84
4.1.3. Dissolução intrínseca.....	85
4.1.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho .....	87
4.1.5. Análise térmica.....	90
4.1.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	95
4.1.7. Ação antagonista do complexo VAL:β-CD no efeito pressor da angiotensina II.....	101
4.2. Sinvastatina e lovastatina.....	106
4.2.1. Solubilidade Termodinâmica.....	106
4.2.2. Difratomia de raios-X.....	110
4.2.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho .....	112
4.2.4. Análise térmica.....	115
4.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	124
Conclusões.....	130
Referências bibliográficas.....	135
Anexo 1 – Valsartan.....	147
Anexo 2 – Sinvastatina.....	155
Anexo 3 – Lovastatina.....	163





## 1.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é um dos mais graves problemas de saúde pública enfrentados em todo o mundo, apresentando elevada prevalência entre a população adulta. Cerca de vinte e cinco por cento da população adulta mundial e sessenta por cento da população com idade superior a sessenta anos são acometidos por distúrbios pressóricos caracterizados pela alta pressão (OPARIL, 2001; V DIRETRIZES, 2006).

O desenvolvimento do quadro hipertensivo está relacionado a fatores ambientais, genéticos e demográficos (OPARIL, 2001; V DIRETRIZES, 2006). Além desses fatores, pode-se observar que a presença de fatores de risco, como, por exemplo, hiperlipidemia, pode agravar o quadro hipertensivo levando principalmente à instalação de doença aterosclerótica. Nos EUA, quarenta por cento dos pacientes hipertensos apresentam hiperlipidemia (OPARIL, 2001; CRIQUI, 2001).

Dentre as doenças crônicas, a hipertensão arterial destaca-se pelo seu elevado custo médico e social, principalmente em função de sua relação direta com o aparecimento de complicações como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular nas extremidades do corpo. No Brasil, desde a década de sessenta, as doenças cardiovasculares se tornaram a principal causa de morte no país, superando doenças infecto-contagiosas e outras (V DIRETRIZES, 2006).

A mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares foi de 27,3% no ano de 2003 e desconsiderando causas denominadas como mal definidas e por violência, este valor salta para 37% do total de óbitos naquele ano. Já a prevalência da hipertensão arterial situa-se entre 22,3% a 43,9% conforme região avaliada. Nestes casos o critério para diagnóstico da hipertensão arterial em adultos seria pressão sistólica maior ou igual a 140 mmHg e pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg. No que concerne aos custos de internação das doenças cardiovasculares estima-se que no ano de 2005 o Ministério da Saúde teve custo global de R\$ 1.323.775.008,28 atendendo cerca de 1.180.140 pacientes (V DIRETRIZES, 2006).

Considerando os fatores maiores que predis põem a hipertensão arterial citam-se o tabagismo, dislipidemias, diabetes melito, idade superior a 60 anos e histórico familiar (V DIRETRIZES, 2006). É relevante considerar que a maioria dos pacientes com pressão alta apresenta algum dos fatores de risco citados. O paciente diabético tido clinicamente como portador de aterosclerose pode ser considerado como mais susceptível ao desenvolvimento de hipertensão. Neste grupo a incidência da doença é cerca de duas vezes e meio mais comum que na população em geral. Esse agravante eleva muito o risco cardiovascular. Diante de todo esse quadro, a manutenção de níveis pressóricos elevados ( $\geq 140\text{mmHg}/\geq 90\text{mmHg}$ ) após tentativas de mudanças no estilo de vida, indica a necessidade de inserção da terapia medicamentosa (CONSENSO, 2000; CRIQUI, 2001; OPARIL, 2001; V DIRETRIZES, 2006; III DIRETRIZES, 2002; LIANG & MANSON, 2003).

Para o tratamento da hipertensão tem-se como objetivo principal, a redução do risco cardiovascular com conseqüente redução da morbimortalidade. No que concerne à terapia

farmacológica para tratamento da hipertensão observa-se que em apenas metade dos casos se consegue efetivamente controlar a pressão alta empregando-se apenas um fármaco. Estudos relativamente curtos, realizados em períodos que variaram de três a quatro anos, indicaram que os fármacos mais estudados nas monoterapias foram os diuréticos, inibidores da ECA, bloqueadores dos receptores AT1, dentre outros. Outro ponto em destaque refere-se à situação que em quase setenta por cento dos casos, a terapia com este único fármaco é abandonada ou substituída nos primeiros seis meses de tratamento. Muitas podem ser as causas deste abandono ou substituição, como efeitos adversos, eficácia reduzida ou dificuldade de aderência ao esquema posológico, mas é consenso que em todas as situações o abandono ou ineficiência do tratamento contribuem para agravamento do quadro hipertensivo (OPARIL, 2001; V DIRETRIZES, 2006).

A baixa aderência ao esquema terapêutico prescrito se apresenta como uma das maiores barreiras para o controle da hipertensão. A reduzida adesão ao tratamento pode ser justificada pelo alto custo da medicação, orientação insuficiente sobre os riscos de não se seguir o tratamento, complexidade do esquema terapêutico, reduzida escolaridade do paciente, efeitos adversos dos medicamentos e descomprometimento com o acompanhamento médico (OPARIL, 2001; V DIRETRIZES, 2006). Pesquisas da Organização Mundial de Saúde mostram que a continuidade e adesão a tratamentos crônicos são reduzidas. Apenas quarenta e três por cento dos pacientes hipertensos aderem ao tratamento. Dentre os pacientes com colesterol elevado este valor chega apenas a vinte e cinco por cento. Entre todas as doenças crônicas, a adesão ao tratamento é mínima para os diabéticos tipo 2 chegando a apenas quinze por cento (WHO, 2003).

A escolha do esquema terapêutico mais indicado para o paciente hipertenso depende da condição na qual ele se encontra, se há ou não fator de risco cardiovascular, custo e acesso ao tratamento. Os sistemas de liberação controlada de fármacos são preferidos por promoverem maior adesão à terapia anti-hipertensiva já que na maioria das vezes consegue-se reduzir a posologia para uma única administração diária (OPARIL, 2001).

Considerando ainda as alternativas para o tratamento farmacológico é preconizado também que, se a terapia empregando apenas um fármaco não surtir o efeito desejado, é necessário associar outro fármaco ao tratamento para que ambos, agindo por mecanismos distintos ou não, possam atuar de maneira sinérgica ou aditiva contornando mais efetivamente o quadro hipertensivo. Esta associação permite ainda redução nas doses administradas, diminuindo assim os efeitos adversos que são dose dependente (OPARIL, 2001). Mais interessante seria a associação destes fármacos em uma única forma farmacêutica para diminuir o número de unidades a serem administradas por dia (WHO, 2003).

Os anti-hipertensivos orais podem ser divididos em classes distintas que os diferenciam por mecanismo de ação. Podem-se citar os diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas dos receptores AT1 da angiotensina II (V DIRETRIZES, 2006).

Hoje no mercado brasileiro há grande variabilidade de produtos que além da monoterapia contemplam a modulação da liberação ou associação de mais de um fármaco na mesma forma farmacêutica. Fármacos até então clássicos foram incluídos em novas formulações que permitiram alteração do seu perfil de liberação (Tabela 1.1, p.5) ou associados em uma mesma apresentação (V DIRETRIZES, 2006).

A associação de fármacos em uma mesma forma farmacêutica mostra-se interessante por razões clínicas, mas também tecnológicas e comerciais. Frequentemente a combinação é importante para o tratamento anti-hipertensivo em função do efeito aditivo ou sinérgico alcançado, trazendo, além disso, mais conforto para o usuário reduzindo o número de administrações por dia. Vários trabalhos destacam a validade da associação dos fármacos neste tipo de terapia.

Gleim e colaboradores (2006) realizaram estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, de grupos paralelos, com pacientes hipertensos com mais de dezoito anos administrando losartan (bloqueador do receptor AT1) na dose 100 mg ou losartan 100 mg associado a hidroclorotiazida (diurético) na dose de 12,5 mg. Os resultados indicaram que a associação entre os dois fármacos foi capaz de reduzir de forma significativa a pressão arterial dos pacientes quando comparada à monoterapia. Embora o estudo fosse de curta duração pôde-se perceber a validade da associação proposta. Trabalhos semelhantes confirmaram os resultados acima sugerindo então que a associação tem mais efetiva capacidade de redução de níveis pressóricos em pacientes hipertensos (GRADMAN et al., 2002; LACOURCIÈRE & POIRIER, 2003).

Estudos realizados com ratos diabéticos indicaram que a associação de valsartan e verapamil, respectivamente representantes do grupo dos antagonistas dos receptores AT1 e bloqueadores dos canais de cálcio, elevaram a sobrevida dos animais em aproximadamente cinquenta por cento se comparados aos animais do grupo que recebeu monoterapia. Os resultados indicam ainda que a associação dos dois fármacos permite redução de vinte a trinta por cento na dose de ambos. Comparando a sobrevida dos animais tratados com a associação de valsartan e verapamil com o grupo de animais não tratados, a sobrevida foi cento e vinte e cinco por cento superior no grupo tratado. O aumento da sobrevida dos animais também é devido à atenuação de danos renais característicos em diabéticos. A associação proposta poderia também ser empregada para o tratamento preventivo da hipertensão com redução da proteinúria e diminuição da velocidade de instalação de lesões renais (WEBB & GASPARO, 2001).

Tabela 1.1: Fármacos incorporados em formulações de liberação controlada ou prolongada\*

Classe	Fármaco	Forma farmacêutica	Nome comercial
Diurético tiazídico	Indapaminda	Comprimido	Natrilix SR ®
		Comprimido revestido	Indapen SR ®
Betabloqueador	Metoprolol	Comprimido revestido	Selopress ZOK ®
	Propranolol	Cápsula	Rebaten LA ®
Alfabloqueador	Prazosina	Cápsula	Minipress SR ®
		Comprimido	Carduran XL ®
Bloqueador do canal de cálcio	Verapamil	Drágea	Dilacoron Retard ®
		Cápsula	Balcor Retard ®
	Nifedipino	Cápsula	Angiolong Ap
		Comprimido	Adalat ® Retard
		Comprimido	Adalat ® Oros
		Comprimido	Cardalin Retard ®
		Comprimido	Dilaflux Retard ®
Comprimido	Oxcord Retard®		

\*Adaptado de: V DIRETRIZES, 2006.

Abordagens sobre associações entre fármacos são comumente encontradas na literatura onde se discute basicamente a efetividade e os ganhos terapêuticos obtidos. Mahmud & Feely (2007) publicaram trabalho onde pacientes brancos com idade de 50,1 anos em média foram divididos em cinco grupos, sendo que quatro dos cinco grupos receberam um tipo de fármaco diferente caracterizando o tratamento como monoterápico. Os fármacos foram anlodipina (5 mg), atenolol (50 mg), captopril (50 mg) e bendroflumetiazida (2,5 mg). O quinto grupo recebeu todos os quatro fármacos citados, mas a dose empregada foi de um quarto do valor administrado aos outros pacientes. Como resultado observou-se que a redução da pressão foi de 19,2 mmHg para o grupo que recebeu a associação dos medicamentos enquanto que para os grupos que receberam monoterapia a redução foi de 10,2 mmHg para a anlodipina, 10,2 mmHg para o atenolol (50 mg), 11,1 mmHg para o captopril (50 mg) e 6,1 mmHg para a bendroflumetiazida (2,5 mg). A combinação de doses reduzidas de representantes dos quatro grandes grupos de anti-hipertensivos foi mais eficaz que a dose padrão de cada anti-hipertensivo administrado individualmente.

## 1.2. Hipercolesterolemia

Dentre as principais causas de mortalidade no Brasil, a doença aterosclerótica tem destaque em função de ser uma doença multifatorial relacionada ao perfil lipídico do indivíduo. A alteração do perfil lipídico é denominada por hipercolesterolemia isolada nos casos onde há aumento do colesterol

total e da fração de colesterol de baixa densidade (LDL); hipertrigliceridemia isolada quando há aumento dos triglicérides (TRG); hiperlipidemia mista com destaque para o aumento do colesterol total e dos triglicérides; e quando há redução dos níveis do colesterol de alta densidade (HDL) associado ou não ao aumento de TRG ou LDL (III DIRETRIZES, 2001).

No Brasil, estima-se que 8,8% da população apresenta elevação da taxa de colesterol total. As dislipidemias são classificadas etiológicamente como primárias e secundárias, sendo as primárias associadas à hereditariedade e as secundárias causadas por doenças ou uso de medicamentos. Dentre as doenças citam-se o diabetes, obesidade, alcoolismo, entre outras (III DIRETRIZES, 2001).

A alteração no perfil lipídico do indivíduo, seja por causa primária ou secundária, está intimamente relacionada à aterosclerose, visto que o LDL é fator causal e independente para tal. Com instalação do quadro hiperlipêmico e observância do estado de aterosclerose, automaticamente eventos hipertensivos passam a ser notados. A presença de aterosclerose é então determinante para instalação do quadro hipertensivo, sendo necessário que os níveis de LDL retornem para valores considerados normais, menores ou igual a  $130 \text{ mg.dL}^{-1}$ . Assim os fatores determinantes para instalação do quadro de aterosclerose seriam o fumo, diabetes melito, HDL menor que  $40 \text{ mg.dL}^{-1}$ , idade, histórico familiar e hipertensão arterial sistêmica ( $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ ) (III DIRETRIZES, 2001; TOBERT, 2003).

Para o tratamento das dislipidemias destacam-se as estatinas, fibratos, ácido nicotínico e resinas de troca. Dentre as estatinas a dose usual de qualquer uma delas varia de 10 a 80 mg ao dia.

Para o tratamento de dislipidemias envolvendo estratégias medicamentosas, a escolha das estatinas é quase regra. Os fármacos pertencentes ao grupo das estatinas como, por exemplo, lovastatina e sinvastina, tem por mecanismo básico a inibição da enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase. Esta enzima está diretamente envolvida na biossíntese de colesterol. O emprego destas estatinas pode efetivamente reduzir de 18% a 55% em média o LDL circulante. Além disso, há elevação de 5% a 15% na concentração de HDL e redução de triglicérides da ordem de 7% a 30% (III DIRETRIZES, 2001; TOBERT, 2003).

As tentativas para contornar os efeitos adversos inerentes à terapia com estatinas e outros fármacos, estimulou o desenvolvimento de novos sistemas. Nesse sentido, Myers & Sanghvi (2000) propuseram a associação de estatinas e niacina em microesferas para administração diária dos mesmos. As estatinas de maneira geral apresentam reduzida solubilidade em água, proporcionando biodisponibilidade de aproximadamente dez a vinte por cento após administração oral. Ao contrário das estatinas, a niacina é altamente hidrossolúvel, também está envolvida no tratamento de hiperlipidemia, mas está associada a efeitos tóxicos quando administrada em altas concentrações e desconforto gástrico após longos períodos de administração oral. Na tentativa de elevar a biodisponibilidade das estatinas e contornar efeitos adversos da niacina, propôs-se a formulação de um sistema polimérico. A esse sistema foi adicionado tensoativo com objetivo de elevar a solubilidade da estatina após administração oral. A incorporação da niacina ao sistema polimérico permitiria por outro lado a sustentação de sua liberação de forma a contornar o desconforto gástrico e efeitos

tóxicos exercidos pela mesma. Os tensoativos selecionados foram os poloxâmeros, especialmente o Pluronic F68® e os derivados do polietilenoglicol.

Microesferas foram preparadas separadamente com cada um dos fármacos para posteriormente serem associadas em uma única forma farmacêutica como, por exemplo, cápsulas ou comprimidos de uso oral. Especificamente as microesferas contendo niacina devem ser revestidas para efetivamente proporcionar liberação prolongada do fármaco. Os polímeros empregados para revestimento podem ser derivados da celulose (etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose), vinílicos (polivinilpirrolidona – PVP) ou acrílicos (polimetilmetacrilatos) (MYERS & SANGHVI, 2000).

Outras associações de fármacos para tratamento de dislipidemias e hipertensão também foram contempladas. Liang & Manson (2003) avaliaram a associação de fármacos que atuam inibindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona a fármacos envolvidos na redução do colesterol e anticoagulantes. O objetivo da associação é atuar em várias frentes de modo sinérgico controlando a hipertensão, reduzindo o colesterol e impedindo a formação de ateromas e trombos no organismo.

Todos estes eventos são comuns a pacientes hipertensos, principalmente os diabéticos. Os fármacos considerados para inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona são os inibidores da ECA (p. ex. enalapril e captopril) e antagonistas dos receptores AT1 (p. ex. losartan e valsartan). Já os princípios ativos que atuam reduzindo o colesterol são as estatinas e vitaminas do complexo B. O anticoagulante abordado foi o ácido acetil salicílico. A grande vantagem do estudo realizado é a administração diária da associação de todos os fármacos em uma mesma forma farmacêutica, ao passo que anteriormente cada um destes medicamentos era administrado individualmente. A segurança, o conforto do paciente e a adesão ao tratamento foram a principal meta. Estudos clínicos envolvendo a associação proposta mostraram que há redução significativa do risco cardiovascular nos pacientes tratados. Esta redução foi mais significativa do que no estudo feito em paralelo utilizando apenas um fármaco para tratamento de dislipidemia (CHUNGI & IORIO, 2003).

Nenhum estudo empregando sistemas de liberação controlada envolvendo estatinas e anti-hipertensivos foi encontrado, estratégia esta que se mostra interessante, pois além da associação de medicamentos que atuem de maneira sinérgica, maior seria também a adesão ao tratamento já que o número de administrações poderia ser ainda mais reduzido.

### 1.3. Propriedades físico-químicas dos fármacos e biodisponibilidade oral.

O planejamento e desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas são conduzidos de forma semelhante, tanto para medicamentos similares quanto para genéricos. Busca-se alcançar um produto que apresente qualidade, para que futuramente esse possa ser submetido a estudos de equivalência ou bioequivalência. Diferentemente dos anteriores, os medicamentos inovadores tem que apresentar eficácia, segurança e qualidade por ocasião do registro. Assim sendo, estudos denominados como de pré-formulação se propõem ao conhecimento do princípio ativo, excipientes, formas farmacêuticas, processos e outras variáveis capazes de comprometer ou alterar a

biodisponibilidade final da substância ativa (BRASIL, 2004; AULTON, 2001; JOHNSON, 2006; WATERBEEMD et al., 2008; KRISHNA & YU, 2009; QIU et al., 2009).

A eficiência e a eficácia de um fármaco estão diretamente relacionadas a sua biodisponibilidade. A via de administração do princípio ativo é um importante fator a ser considerado nesse caso. Por ser a maneira mais conveniente e confortável para a maioria dos pacientes, a via oral é a via de administração preferencial para as formas farmacêuticas.

Dentre as formas farmacêuticas disponíveis, os sólidos orais são os mais comumente escolhidos por proporcionarem mais fácil administração, por apresentarem maior estabilidade físico-química e microbiológica, dentre outras. No que concerne à forma farmacêutica e às condições fisiológicas do trato gastrointestinal, quando o fármaco é administrado em solução aquosa, sua absorção se dá mais rapidamente do que naqueles casos onde se faz administração de solução oleosa, suspensão ou sólido oral, visto que se misturam mais prontamente à fase aquosa presente na luz do trato gastrointestinal. A dissolução é considerada então um fator determinante para a absorção dos fármacos, pois a solubilização no meio de absorção é condição essencial para a ocorrência da permeação e alcance da circulação sistêmica. A partir disso, o trabalho de pré-formulação tem seu início quase que obrigatório com o fármaco ou fármacos que serão inseridos na forma farmacêutica. Conhecer profundamente suas características físico-químicas torna-se então determinante para o futuro sucesso deste produto, já que, se produzido dentro de padrões de qualidade, a chance de variabilidade torna-se cada vez menor. As variáveis físico-químicas relacionadas aos fármacos e mais relevantes no processo de planejamento e desenvolvimento destes sólidos referem-se então à solubilidade intrínseca, lipofilia, logaritmo do coeficiente de partição  $o/a$  (LOG P), pKa, massa molar, grau de ionização, grau de cristalinidade, polimorfismo e granulometria (AULTON, 2001; JOHNSON, 2006; WATERBEEMD et al., 2008; KRISHNA & YU, 2009; QIU et al., 2009).

A solubilidade dentre todos os parâmetros apresentados anteriormente é a mais importante propriedade intrínseca capaz de determinar a condução dos estudos de desenvolvimento farmacêutico. Considerando que a via oral é a via de escolha mais confortável para administração de fármacos, várias pesquisas se propõem a buscar alternativas que por ventura promovam a alteração da cinética de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade de fármacos, principalmente daqueles que apresentam problemas de dissolução no TGI. O TGI é um sistema dinâmico capaz de interferir significativamente nesta cinética de dissolução determinando diretamente a absorção de uma substância.

Atualmente há algumas alternativas que permitem melhorar a dissolução intrínseca de uma substância ativa como, por exemplo, a modificação de sua forma cristalina pela alteração inicial das condições de síntese desse fármaco ou mesmo submetendo-o a um processo físico como moagem. De qualquer forma a solubilização de uma substância seria promovida nos casos onde as interações existentes no estado sólido fossem reduzidas ou alteradas, já que os polimorfos, nada mais são que arranjos moleculares distintos para uma determinada substância e podem apresentar solubilidade variada. Ainda no que concerne a arranjos moleculares, se um produto cristalino tivesse condições de

ser convertido em produto amorfo, onde a organização molecular é pouco significativa, teríamos melhora da dissolução já que os produtos amorfos têm cinética de dissolução significativamente superior se comparada a um material cristalino. Além da amorfização, mostram-se como alternativas interessantes para melhora da dissolução de uma substância a utilização de seus sais, dispersões sólidas ou casos onde o fármaco apresenta-se complexado a outra molécula (BRUNTON et al., 2005; CROWDER et al., 2003).

Estudos publicados por Kin e colaboradores (2008) avaliaram a interferência do processamento da atorvastatina cálcica na dissolução e biodisponibilidade da mesma. Atorvastatina cálcica é um fármaco cristalino, hidratado, de biodisponibilidade dependente de sua dissolução no TGI, com coeficiente de partição o/a igual a 5,05 (TSRL INC, 2010) e dissolução intrínseca de 84,9  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$ . Após obtenção do pó amorfo, anidro e na forma nanoparticulada, a avaliação da velocidade de solubilização indicou ganho de 3,3 vezes na velocidade de dissolução implicando em elevação da biodisponibilidade em 2,9 vezes. A concentração plasmática máxima ( $C_{\text{max}}$ ) também cresceu passando de 504,4  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para 2133,4  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Na mesma linha de raciocínio, o cilostazol, que é um fármaco que apresenta problemas de biodisponibilidade em função de sua reduzida solubilidade no TGI, teve sua granulometria reduzida na tentativa de avaliar a interferência desta variável na velocidade e taxa de dissolução do fármaco. Basicamente, a utilização de nanopartículas de cilostazol com diâmetro médio igual a 220 nanômetros fez com que  $C_{\text{max}}$  chegasse a 17832  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  com biodisponibilidade 6,5 vezes maior que o produto com diâmetro médio de 13  $\mu\text{m}$ .  $C_{\text{max}}$  chegou apenas a 582  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  empregando-se esta última matéria-prima (JINNO et al., 2006).

Os fármacos com problema de dissolução são maioria dentre os produtos genéricos, similares e/ou de referência no mercado nacional. Esta porcentagem ultrapassa os cinquenta por cento, sendo que os dois medicamentos genéricos, bem como similares e/ou referência, mais comercializados no ano de 2008 apresentam problemas de dissolução no TGI com biodisponibilidade dependente desta dissolução (IMS HEALTH, 2010; TSRL INC, 2010). A sinvastatina na forma de comprimido é o genérico mais vendido no Brasil, seguida pelo omeprazol. Ainda no mercado brasileiro o piroxicam e a nimesulida (cLOG P de 3,21) são considerados como fármacos de difícil solubilização no TGI e com biodisponibilidade reduzida, mas foram associados à  $\beta$ -CD com objetivo de promover sua dissolução no organismo humano, aumentar estabilidade e biodisponibilidade garantindo manutenção da concentração plasmática maior e por tempo superior àquele obtido com o fármaco na ausência da ciclodextrina. A grande vantagem da complexação do piroxicam à  $\beta$ -CD refere-se à maior velocidade de dissolução, garantido que  $C_{\text{max}}$  seja alcançado entre os primeiros trinta e sessenta minutos seguidos da administração oral, enquanto que para o produto convencional este tempo chega a quatro horas. O produto na forma isolada proporciona metade da concentração plasmática alcançada com o complexo formado pelo fármaco e a ciclodextrina (ACHÉ, 2010). Já a nimesulida também apresenta dados semelhantes, pois após complexação com a  $\beta$ -CD a biodisponibilidade cresce 1,9



vezes,  $C_{max}$  passa de  $12,112 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $25,630 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e por fim o alcance de  $C_{max}$  cai de 4,4 horas para 3,6 horas (BIETTI, 1994).

O conceito de solubilidade associado ao de permeabilidade no trato gastrointestinal é o fundamento para o Sistema de Classificação Biofarmacêutica dos fármacos proposta por Amidon e colaboradores (1995). Portanto, a solubilidade em água pode atrasar ou limitar a absorção do fármaco após uma administração oral, consistindo então em mais um desafio para o desenvolvimento farmacotécnico. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Fármacos (BCS) aborda a interferência das propriedades físico-químicas do fármaco sobre a biodisponibilidade em formas farmacêuticas de liberação imediata, considerando-se que os fármacos podem ser enquadrados em quatro classes distintas. Esta classificação baseia-se na solubilidade da maior dose do fármaco terapeuticamente aceita e na permeabilidade celular desta substância ativa, permitindo a subdivisão dos fármacos em quatro classes distintas. A primeira classe inclui os fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade através da membrana celular de enterócitos. Na segunda classe estão inseridos os fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade. Na terceira classe estão incluídos aqueles que têm alta solubilidade, mas baixa permeabilidade, e por fim a quarta classe que inclui os fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Quadro 1.1) (AMIDON, 1995; FDA, 2000; MARTINEZ & AMIDON, 2002; JOHNSON, 2006).

Variáveis relacionadas ao fármaco

	Solubilidade	Permeabilidade	
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

Quadro 1.1: Sistema para Classificação Biofarmacêutica de Fármacos

Este sistema de classificação biofarmacêutica tornou-se então 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 produtos podem então ser melhorados de forma que problemas na velocidade de dissolução e permeabilidade sejam minimizados garantindo maior biodisponibilidade oral dos fármacos administrados. Assim sendo, dependendo da tecnologia empregada um fármaco de Classe II com problemas de dissolução, poderia ser recategorizado como de Classe I, caso problemas de dissolução 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 trabalhado. Já a permeabilidade intrínseca da molécula é mais difícil de ser alterada, impedindo muitas vezes ganhos efetivos na absorção dos fármacos. A permeabilidade pode crescer apenas nas situações onde a taxa de dissolução quando

elevada propicia maior taxa de permeação (LOFTSSON, 2002). Fridriksdóttir e colaboradores (1996) estudaram o  $\beta$ -estradiol, um fármaco de Classe I, mas com biodisponibilidade oral reduzida e 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  $\beta$ -CD garantindo melhor solubilidade do complexo em relação ao fármaco isolado retornando 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.

Posteriormente à dissolução do fármaco no líquido presente no trato gastrointestinal, a molécula deve apresentar relativa lipossolubilidade para conseguir atravessar a bicamada lipídica das membranas celulares dos enterócitos por difusão passiva, seguindo gradiente de concentração em virtude de sua solubilização. A membrana plasmática atua como barreira formada por uma dupla camada de lipídeos anfifílicos com suas caudas lipofílicas orientadas para dentro, a fim de formar uma fase hidrófoba contínua e suas cabeças hidrofílicas voltadas para a luz intestinal e espaço intracelular. Pode-se afirmar então que quanto maior a lipossolubilidade de um fármaco melhor será seu processo de absorção no trato gastrointestinal, desde que esta mesma molécula já esteja dissolvida no meio de absorção. Este grau de lipossolubilidade ou hidrossolubilidade pode ser mensurado através da determinação do coeficiente de partição óleo/água ou LOG P. Considera-se que as moléculas muito lipofílicas, ou seja, com LOG P acima de quatro, tem dificuldade de solubilização com facilidade de permeação passiva através de enterócitos. Já um LOG P muito baixo, característico de produtos muito hidrofílicos, apresentaria problemas no que se refere à permeação, sendo desconsiderados problemas com a solubilização dos mesmos em solução aquosa. Martinez & Amidon (2002) e Bajorath (2002) citam que o LOG P ótimo para que se observe maior difusão situa-se, geralmente, entre 2 e 7, sendo 4 o LOG P mais interessante em média. Já Doherty (2005) cita que associando o conceito de solubilidade ao de permeabilidade a molécula deve apresentar LOG P entre 1 e 3.

Uma das técnicas disponíveis para avaliação do grau de lipofilia de fármacos é o método *shake flask*. Este método é recomendado para determinação do coeficiente de partição óleo/água de substâncias, sugerido como técnica de escolha pelo United States Environmental Protection Agency (EPA). Este método baseia-se no coeficiente de partição das substâncias, tendo como solventes dois líquidos imiscíveis, água e n-octanol, com capacidade de avaliar a transferência de fármacos a partir do meio aquoso para o meio não aquoso. Fazendo-se correlação com o organismo humano o líquido presente no Trato Gastrointestinal (TGI) seria o meio aquoso, onde o fármaco encontra-se

solubilizado e o meio não aquoso seria a membrana celular dos enterócitos, formada basicamente por fosfolipídeos (EPA, 1996).

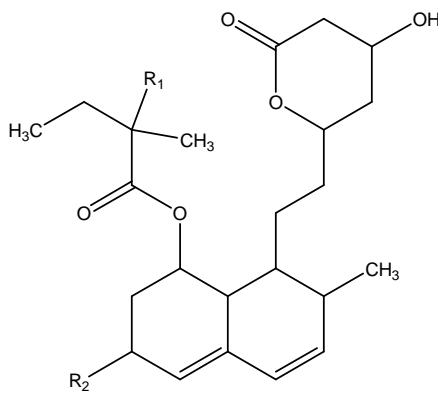
O coeficiente de partição é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio do fármaco dissolvido nas duas fases imiscíveis que compõem o sistema.

$$P_{o/a} = \frac{[C_{n-octanol}]}{[C_{\text{água}}]}$$

Onde  $P_{o/a}$  é o coeficiente de partição e  $C_{n-octanol} / C_{\text{água}}$  o quociente entre as concentrações da substância em estudo nos solventes n-octanol e água. Frequentemente o coeficiente de partição  $P_{o/a}$  é apresentado na forma logarítmica na base 10, LOG P.

O princípio do teste consiste na interação de uma substância com os dois solventes até que se alcance o equilíbrio. Posteriormente a concentração do fármaco é determinada nas duas fases do sistema empregando-se a técnica analítica mais adequada. Uma das limitações da técnica refere-se ao estudo de produtos ionizáveis, requerendo ajustes de forma a aperfeiçoá-la, como por exemplo, empregando solução tampão em substituição à água (EPA, 1996).

Muitos são os trabalhos onde o conceito de partição óleo/água foi empregado como importante variável para avaliação da eficiência de sistemas contendo fármacos. Tirucheraí & Mitra (2003) dispunham de ganciclovir, um fármaco com alta solubilidade em água e conseqüentemente difícil permeação por membranas, inclusive o do epitélio da córnea. Na tentativa de melhorar a permeação do fármaco através da mucosa ocular foram preparados pró-fármacos sintetizados pela esterificação do ganciclovir, gerando compostos menos solúveis que conseguiriam permear mais facilmente a membrana ocular. Após esterificação observou-se elevação do valor nominal de LOG P, indicando aumento da lipofilia do fármaco. Nos estudos *in vivo* foi comprovado que a permeação foi mais significativa para os ésteres, especificamente o dibutirato e o dipropionato de ganciclovir. Algumas estatinas inibidoras competitivas da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA) também apresentam diferentes valores para LOG P conforme sua estrutura química. Esses fármacos são administrados na maioria das vezes como pró-fármacos, na forma de lactonas, que são hidrolisadas após absorção, gerando hidroxiácidos que apresentam atividade hipolipemiante. Dentre as estatinas estudadas concluiu-se que a ordem crescente de LOG P seria pravastatina << mevastatina < lovastatina < sinvastatina. As diferenças observadas estão relacionadas à estrutura química destacando que a pravastatina é administrada na forma de lactona hidrolisada e as demais estatinas não. Dentre as demais estatinas estudadas a diferença de lipofilia está relacionada à presença ou não de grupamentos metila em  $R_1$  e  $R_2$ , conforme Figura 1.1 (p.13) (SERAJUDDIN et al., 1991).



Fármaco	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Mevastatina	H	H
Lovastatina	H	CH <sub>3</sub>
Sinvastatina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Figura 1.1: Estrutura química de diferentes estatinas utilizadas como hipolipemiantes orais.

No que concerne à variável granulometria, avaliando-se os fármacos que apresentam reduzida solubilidade em água, sua superfície de contato com o solvente em questão é uma variável de grande importância, visto que, após administração oral, sua biodisponibilidade frequentemente varia conforme a granulometria do mesmo (HINTZ & JOHNSON, 1989). Estudos realizados por Hintz & Johnson (1989) utilizando um fármaco lipossolúvel, que não sofre ionização significativa em água e com diferentes tamanhos de partículas, indicaram que a redução da granulometria do produto ativo resultou na aceleração da velocidade e taxa de dissolução. Estes estudos foram conduzidos com cápsulas duras contendo o fármaco com subsequente realização do teste de dissolução para determinação do perfil de dissolução do produto ativo. Sendo assim, para os fármacos incluídos na classe II e IV (BCS) observar-se-ia elevação da biodisponibilidade pela redução da granulometria. Em outra situação a utilização de partículas micronizadas está relacionada à maior probabilidade de aglomeração dos pós com consequente redução da biodisponibilidade. A utilização de agentes molhantes auxilia na dispersão destas partículas de maneira a potencializar a solubilização pela redução da tensão interfacial entre o fármaco e a água. Outras matérias-primas podem ser adicionadas à forma farmacêutica de maneira a interferir na solubilização, como agentes dispersantes, exemplificados pelos polietilenoglicóis e polivinilpirrolidonas, ou agentes que formam complexos com o fármaco, como as ciclodextrinas. Dentre todos estes exemplos há limitações apenas para o uso de surfactantes que para promover efetiva solubilização são requeridos em elevadas concentrações, comprometendo a segurança da formulação em função da elevada chance de aparecimento de efeitos adversos (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

Outros medicamentos podem apresentar alteração de biodisponibilidade em função da granulometria do fármaco incorporado na forma farmacêutica. Avaliações realizadas com comprimidos de digoxina indicaram que as diferenças encontradas em testes de dissolução de comprimidos disponíveis no mercado dependem, dentre outros fatores, da granulometria do princípio ativo. Além da granulometria, outro fator considerado é ao grau de cristalinidade do fármaco bem como o tipo de cristal encontrado (BRAMANTI et al., 1989). Bastami & Groves (1978) em outro estudo, avaliaram cápsulas e comprimidos contendo fenitoína sódica e concluíram que a composição dos excipientes na formulação pode comprometer a dissolução do fármaco. Este fenômeno é mais

crítico quando há na composição do produto matérias-primas preparadas à base de cálcio (carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e sulfato de cálcio) e magnésio (estearato de magnésio). A fenitoína é um ácido fraco, com pKa de 8,3, que ao chegar no estômago, onde o pH varia entre 1,9 e 2,6, pode precipitar na forma não ionizada. Com a formação desta base livre, precipitada e menos solúvel em meio aquoso, a dissolução do fármaco diminui comprometendo sua biodisponibilidade. Florence e colaboradores (1974) perceberam variações de até 180% no perfil de dissolução *in vitro* de digoxina em função da granulometria, sendo que produtos micronizados foram mais rapidamente solubilizados em água contendo polissorbato 80. A análise de matérias-primas distintas indicou que após o processo de moagem e trituração, além da redução da granulometria houve também alteração do estado cristalino da digoxina, com formação de maior proporção de produto amorfo. A maior proporção de material amorfo está relacionada à elevação da taxa de dissolução do fármaco. Já nos estudos de análise térmica observou-se um fenômeno endotérmico em 170°C em todas as matérias-primas analisadas, sugerindo relação com a porcentagem de material amorfo presente na amostra. Além disso, encontrou-se diferença significativa no ponto de fusão da digoxina, sendo o valor mínimo medido de 225,5°C e máximo de 241°C.

#### 1.4. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas têm se mostrado como possível alternativa para contornar problemas associados à terapia convencional de fármacos pouco solúveis (e em alguns casos com tendência de formar agregados) ou susceptíveis a degradação. Em princípio, as ciclodextrinas foram utilizadas para elevar a solubilidade de fármacos devido a sua capacidade de formar compostos de inclusão com moléculas hidrofóbicas (SILVEIRA, 1998; CAVALLI et al., 1999). Porém, observou-se que outras características como a fraca absorção de proteínas através de mucosas poderia ser alterada (IRIE & UEKAMA, 1999).

As ciclodextrinas são anéis cíclicos de glicopirranose isoladas por Schardinger em 1904 que observou sua ocorrência natural e denominou-as como alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ) ciclodextrinas. Atualmente estas ciclodextrinas são obtidas a partir do amido por mecanismos enzimáticos (MARTIN DEL VALLE, 2004). A degradação enzimática do amido normalmente gera produtos como a glicose e maltose e também oligômeros de maltose lineares ou ramificados conhecidos como dextrinas. Esta degradação enzimática do amido gerando dextrinas ocorre por hidrólise envolvendo uma molécula de água. Já a degradação enzimática do amido que ocorre na ausência de água, sob ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGT), tem como subproduto cadeias de açúcares que, por mecanismos intramoleculares, formam ciclos denominados ciclodextrinas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993).

As ciclodextrinas são substâncias cristalinas, homogêneas e não higroscópicas encontradas na forma de grandes anéis cíclicos. Estes anéis são formados por seis, sete ou oito subunidades de glicopirranose, unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4). O ciclo contendo seis subunidades é conhecido

como  $\alpha$ -ciclodextrina, enquanto que os ciclos de sete e oito monômeros são conhecidos, respectivamente, como  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas (Tabela 1.2). Além daquelas encontradas naturalmente, pode-se preparar outras ciclodextrinas por rotas de síntese que propiciem a obtenção de  $\beta$ -ciclodextrinas ramificadas. A ramificação mais comum é a maltose, a qual altera fortemente as propriedades físico-químicas da molécula, proporcionando principalmente elevação da solubilidade da  $\beta$ -ciclodextrina modificada (SZENTE et al., 1999). Além da inserção de moléculas de açúcar, outras substituições podem ser feitas principalmente empregando-se grupos hidroxipropila, dimetila, monosuccinila, etc. A inserção destes substituintes só é possível devido à presença de várias hidroxilas que podem ser quimicamente modificadas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993).

Tabela 1.2: Propriedades físico-químicas de ciclodextrinas (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; SZENTE et al., 1999)

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
nº de monômeros de glicopiranosose	6	7	8
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	972	1135	1297
Solubilidade em água - 25°C - (%p/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

A inserção de ramificações na estrutura das ciclodextrinas altera significativamente a solubilidade em soluções hidrofílicas como pode ser observado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Comparação da solubilidade de ciclodextrinas em solventes hidrofílicos a 25°C (%p/v) (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; KIBBE, 2001; SZENTE et al., 1999)

Solvente	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	HP- $\beta$ -CD <sup>a</sup>	DM- $\beta$ -CD <sup>b</sup>
Etanol 100%	insolúvel	insolúvel	> 0,1	> 0,1	2
Etanol aquoso 50%	> 0,1	1,3	2,1	162	70
Acetona	insolúvel	insolúvel	> 0,1	> 1	> 1
Etilenoglicol	9	21	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Propilenoglicol	1	2	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Glicerina	insolúvel	4,3	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Água	14,5	1,85	23,2	50,0	57,1

<sup>a</sup>HP- $\beta$ -CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; <sup>b</sup>DM- $\beta$ -CD: Dimetil- $\beta$ -ciclodextrina; <sup>c</sup>ND: Dado não disponível.

As ciclodextrinas são comumente empregadas hoje em dia tanto na indústria farmacêutica quanto alimentícia, sendo considerada como um excipiente farmacêutico. Este emprego ocorre normalmente sob a forma de complexos de inclusão estáveis com fármacos, flavorizantes, etc. Após administração oral destes complexos, ocorre dissociação onde a ciclodextrina passa a encontrar-se sob a forma livre, passível da ação de microorganismos presentes no cólon que são os principais responsáveis por sua degradação. Após degradação e liberação dos monômeros de maltose e glicose, ocorre absorção dos mesmos que são metabolizados e eliminados sob a forma de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; SINISTERRA et al., 1999).

No que concerne à sua caracterização físico-química, estudos de raios-X das ciclodextrinas indicaram a disposição e localização de átomos e grupamentos específicos como as hidroxilas secundárias - OH2 e OH3 - próximas à borda de maior diâmetro da ciclodextrina e da hidroxila primária ligada ao carbono 6 - OH6 - localizada na outra extremidade da ciclodextrina. Pelos mesmos estudos foi possível ainda determinar que os hidrogênios hidrofóbicos do C3 e C5 e os oxigênios da função éter orientam-se para a cavidade interna da ciclodextrina (Figura 1.2). Por fim, o resultado desta disposição permite a observação de uma superfície externa hidrofílica que possibilita sua dissolução em água e uma cavidade hidrofóbica capaz de acomodar e incluir moléculas hóspede de natureza hidrofóbica (MARTIN DEL VALLE, 2004).

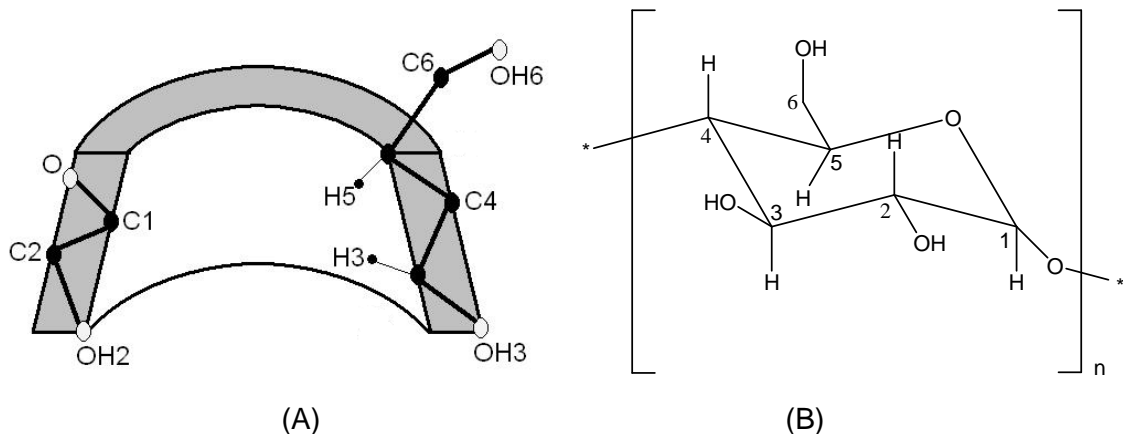


Figura 1.2: Representação esquemática das ciclodextrinas (A) e do monômero de glicopirranose (B).

A possibilidade de empregar as ciclodextrinas como agentes de solubilização deve-se principalmente ao fato destas moléculas possuírem cavidade hidrofóbica e superfície externa hidrofílica. Durante a formação de complexos de inclusão há inserção de moléculas ou grupamentos hidrofóbicos na cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas. Substâncias que antes possuíam solubilidade em água da ordem de  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  passam a apresentar, muitas vezes, solubilidade da ordem de  $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$  (SILVEIRA, 1998; SZENTE et al., 1999).

Durante a formação de um complexo entre a ciclodextrina e um fármaco, inicialmente há deslocamento das moléculas de água que se encontram na cavidade interna da ciclodextrina. As moléculas de água passam a dar lugar para a molécula hóspede anteriormente presente sob a forma solubilizada no meio de complexação. Após este deslocamento é gerado um complexo de inclusão

onde se estabelecem ligações intermoleculares de natureza não covalente. O deslocamento das moléculas de água é energeticamente favorável havendo liberação de energia com redução da entalpia do sistema, ou seja, a inserção da molécula hóspede permite o estabelecimento de interações hidrofóbicas com a ciclodextrina e decréscimo energético do sistema com geração de um complexo mais estável (FRÖMMING & SZEJTLI, 1993; MARTIN DEL VALLE, 2004).

A interação estabelecida entre a molécula hóspede e a ciclodextrina não é permanente, ou seja, o sistema é mantido em equilíbrio dinâmico onde moléculas podem ser inseridas ou deslocadas da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Estes complexos são formados mais facilmente quando as espécies encontram-se solubilizados, o que não inviabiliza processos onde a proporção de solventes é reduzida ou nula (SZENTE et al., 1999; MARTIN DEL VALLE, 2004).

As vantagens relacionadas à complexação são várias, destacando-se a possibilidade de promoção da solubilidade aquosa de moléculas inicialmente muito pouco solúveis; aumento da estabilidade da molécula hóspede com redução da reatividade no estado sólido, caracterizado principalmente por oxidação e hidrólise; possibilidade de isolamento de substâncias inicialmente incompatíveis quimicamente; mascaramento de sabor de produtos desagradáveis ao paladar; e liberação controlada de fármacos (MARTIN DEL VALLE, 2004).

Para que a complexação entre um fármaco e a ciclodextrina aconteça é necessário que pelo menos dois fatores sejam analisados. O primeiro deles relaciona-se a ao tamanho relativo da molécula hóspede, presença de grupos funcionais específicos e o diâmetro da cavidade interna da ciclodextrina escolhida para a complexação. O segundo fator está associado às interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema considerado, ou seja, as interações existentes entre a molécula hóspede, a ciclodextrina e o solvente empregado para a complexação. De forma geral é necessário que a inclusão do fármaco na cavidade da ciclodextrina seja um processo energeticamente favorável (SZENTE et al., 1999; MARTIN DEL VALLE, 2004).

Quando um complexo é administrado por qualquer via, seja ela oral, tópica ou parenteral, observa-se a dissociação do complexo com liberação das espécies participantes. Haverá equilíbrio dinâmico entre as formas livres da ciclodextrina, do fármaco e do complexo de inclusão, regido pela constante de formação do complexo. Dependendo do volume de água que circunda o complexo, esta dissociação pode ser mais rápida, ou seja, o complexo seria desfeito mais brevemente pela diluição do mesmo. Seguido da diluição e deslocamento do fármaco da cavidade da ciclodextrina, dificilmente o mesmo encontraria outra molécula para complexação. Encontrando-se na forma livre o produto ativo estará apto para absorção e distribuição no organismo, pois na forma de complexo não consegue permear membranas celulares lipofílicas em função da hidrofília da ciclodextrina (Figura 1.3, p.18).



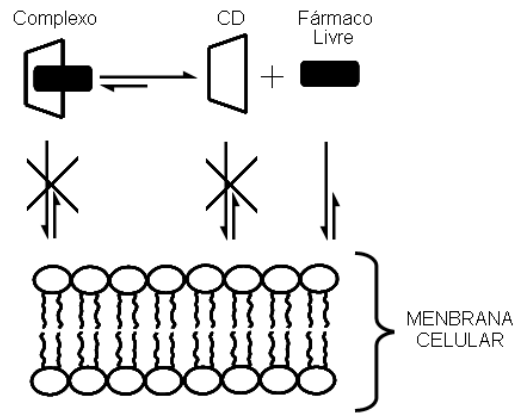


Figura 1.3: Representação da dissociação do fármaco a partir do complexo com ciclodextrina e absorção do fármaco após dissociação.

Consciente do custo financeiro, social e humano das doenças cardiovasculares, melhorar a eficiência e eficácia do tratamento dessas é de extrema importância. Para tal, os fármacos escolhidos para este trabalho são alguns dos mais empregados na terapia, mas apresentam problemas de biodisponibilidade oral. A associação à ciclodextrinas possibilitaria então aumento de solubilidade dos mesmos com conseqüente redução de dose ou aumento de intervalo de administrações. Esta sem dúvida foi a ferramenta norteadora do objetivo desse trabalho.

O presente trabalho tem por objetivo preparar e caracterizar complexos formados entre a  $\beta$ -ciclodextrina com estatinas e valsartan. Estes complexos podem tornar-se então estratégia farmacêutica para preparação de novas formulações e formas farmacêuticas onde estatina e anti-hipertensivo são associados em um único comprimido para maior conforto do paciente.



## 2.1. Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico.

Denominação	Procedência / Lote
Acetonitrila grau HPLC	J.T. Baker, Division Mallinckrodt Baker, INC, Phillipsburg, NJ, EUA.
Acetonitrila grau UV	Synth / Lote nº 2252 / Densidade: 0,775-0,778 g.mL <sup>-1</sup>
Ácido Clorídrico 37%	Quimex / Lote: 25194
Ácido fosfórico	Vetec / Lote nº 003344 / Densidade: 1,834 g.mL <sup>-1</sup>
Água ultrafiltrada	Milli Q plus / Millipore
Álcool etílico PA	Cromoline / Lote 7505/06
Cloreto de potássio PA	Reagen® / Lote nº 564896
Fosfato de potássio monobásico	Reagen® / Lote nº 610467
Fosfato de sódio dibásico	Grupo Química / Lote nº 620465
Fosfato de sódio monobásico	Grupo Química / Lote nº 519335
Hidróxido de potássio PA	Grupo Química / Lote 110446
Hidróxido de sódio PA	Vetec / Lote 047313
Lovastatina	Galena / Lote 040208
Metanol grau HPLC	J.T. Baker, Division Mallinckrodt Baker, INC, Phillipsburg, NJ, EUA.
n-octanol - (álcool octílico)	Vetec / Densidade 0,82 g.mL <sup>-1</sup> / Lote 003121
Sinvastatina	Galena / KY-SI-M20040505
Valsartan	Hetero Labs Limited / Lote: VS0080205
β-ciclodextrina	Aldrich® / Lote nº 03027BT / Massa molar ~1135,01 g.mol <sup>-1</sup>

## 2.2. Equipamentos

### 2.2.1. Análise Elementar

As análises de CHN foram realizadas em equipamento Perkin Elmer CHN 2400.

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

Os espectros de Absorção na Região de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  foram obtidos a partir de espectrofotômetro de infravermelho modelo Spectrum One, Perkin Elmer, Massachusetts, IL, EUA. Os espectros obtidos são resultado da média obtida de 32 varreduras realizadas com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível (UV-VIS)

Os espectros eletrônicos de Absorção na Região do UV-VIS foram registrados em espectrofotômetro HP8453. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

### 2.2.4. Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas em termobalança TGA-50H da Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  com vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , empregando cadinho de alumina e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Amostras de massa entre 2 e 10 mg foram aquecidas de  $25^\circ$  a  $750^\circ\text{C}$ .

### 2.2.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em equipamento DSC-50 da Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ , com vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , cadinho de alumínio e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Amostras de massa entre 1 e 5 mg foram aquecidas de 25 a  $500^\circ\text{C}$ .

### 2.2.6. Difratometria de raios-X de pó (DRX)

Difratogramas de raios-X de pó foram obtidos em um aparelho Rigaku Geigerflex 2037, utilizando monocromador de cobre e radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,54051$ , em ângulos de  $2\theta$  variando de 4 a 60 graus e velocidade de varredura de  $4\theta\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 2.2.7. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz). O solvente DMSO- $d_6$  utilizado foi de pureza isotópica mínima de 99,5% de D, da marca Aldrich. As amostras foram preparadas em tubos de RMN de 8,00 polegadas de comprimento e 5mm 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 mseg. A análise foi conduzida à 27°C.

### 2.2.8. Liofilização

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

### 2.2.9. Medidor de tamanho de partículas

A dimensão do pós (matérias-primas) foi avaliada por equipamento de espalhamento de luz Mastersizer HYDRO 2000M/MU, modelo AWM 2000.

### 2.2.10. Polarimetria

O desvio da luz plano polarizada foi medida em polarímetro digital Quimis, modelo Q760M2, empregando tubo de 10 cm e amostras solubilizadas em metanol na concentração de 10 mg.mL $^{-1}$ .

### 2.2.11. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises cromatográficas em HPLC foram realizadas no equipamento da Shimadzu acoplado com bomba modelo LC10AD, detector UV-VIS modelo SPD10A e coluna de fase reversa da Supelco modelo Supelcosil TM LC18, 25 cm x 4.6 mm com 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, mantida à temperatura ambiente durante a análise. O fluxo isocrático da fase móvel para análise da sinvastatina e lovastatina foi de 1,5 mL.min $^{-1}$ . O volume injetado de amostra foi de 20  $\mu\text{L}$  em todas as situações.

## 2.3. Metodologias

### 2.3.1. Solubilidade

O teste para avaliação da solubilidade dos fármacos em água foi conduzido em triplicata para cada temperatura estudada. Primeiramente foram feitas nove pesagens de 10 mg para cada um dos fármacos. Cada uma das amostras foi dispersa em 1,5 mL de água de Milli Q contidos em eppendorfs de 2,0 mL. Estes eppendorfs foram colocados a 25°, 30° ou 37°C. Após 48 horas em equilíbrio a suspensão foi filtrada em membrana de 0,45 µm e em seguida a solução foi analisada conforme metodologia específica para cada fármaco.

No caso do valsartan a amostra filtrada foi diluída em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> antes da análise.

### 2.3.2. Doseamento dos fármacos

#### 2.3.2.1. Valsartan

O doseamento do valsartan foi conduzido por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta no comprimento de onda de 225 nm. O solvente utilizado foi hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> preparado com água de Milli Q. Foi comum em toda análise a construção da curva padrão com duplicata dos pontos 5, 10, 20 e 30 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.3.2.2. Sinvastatina

O doseamento da sinvastatina foi realizado em HPLC seguindo metodologia da USP 31, onde a fase móvel é composta pela mistura de acetonitrila:tampão fosfato pH = 4,5 na proporção de 65:35 (THE UNITED STATES, 2008).

O tampão fosfato pH = 4,5 foi preparado pela diluição de 3,9 g de fosfato de sódio dibásico em 900 mL de água de Milli Q. O pH foi ajustado para 4,5 com auxílio de solução de ácido fosfórico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Após correção do pH o volume foi ajustado para 1000 mL. Posteriormente, esta fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 µm (membrana de Nylon 66, 0,45 µm x 47 mm, Supelco INC, Bellefonte, PA, EUA). Exatamente antes do uso a solução foi desgaseificada sob vácuo e ultra-som.

O detector foi o de ultravioleta selecionado para leituras em 238 nm e o fluxo de fase móvel ajustado para 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A solução padrão de sinvastatina foi preparada na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> e a curva padrão construída nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 µg.mL<sup>-1</sup>. Um exemplo do cromatograma da sinvastatina obtido nas condições citadas está apresentado no Anexo 2 (p.162).

### 2.3.2.3. Lovastatina

O doseamento da lovastatina foi realizado em HPLC seguindo metodologia da USP 31, onde a fase móvel é composta pela mistura de acetonitrila:tampão fosfato pH = 4,0:metanol na proporção de 50:30:10 (THE UNITED STATES, 2008).

O tampão fosfato pH = 4,0 foi preparado pela diluição de 3,45 g de fosfato de sódio monobásico em 900 mL de água de Milli Q. O pH foi ajustado para 4,0 com auxílio de solução de ácido fosfórico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Após correção do pH o volume foi ajustado para 1000 mL. Posteriormente, esta fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Exatamente antes do uso a solução foi desgaseificada sob vácuo e ultra-som.

O detector foi o de ultravioleta selecionado para leituras em 230 nm e o fluxo de fase móvel ajustado para 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A solução padrão de lovastatina foi preparada na concentração de 40 µg.mL<sup>-1</sup> e a curva padrão construída nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 20 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 2.3.3. Coeficiente de partição octanol/água - LOG P

Para determinação do LOG P da sinvastatina, lovastatina e valsartan, inicialmente fez-se a saturação das fases que compõem o sistema bifásico. A água foi saturada com n-octanol e vice versa. A saturação foi conduzida pela adição de 1 mL do não solvente sobre 50 mL do solvente, mantidos a 37°C por 24 horas. Após este período o excesso de não solvente foi removido com auxílio do funil de separação.

Os fármacos foram solubilizados em n-octanol na concentração de 0,01 mol.L<sup>-1</sup>. Para a lovastatina e sinvastatina, em função da inviabilidade de ionização, o solvente hidrofílico selecionado foi água. Para o valsartan o teste foi conduzido selecionando dois solventes, fluido intestinal e fluido gástrico, sem a adição de enzimas digestivas, com pH de 6,8 e 1,2, respectivamente. Os tampões foram preparados com força iônica de 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. (EPA 1996, THE UNITED STATES, 2008). O tampão ácido clorídrico pH 1,2 foi preparado em balão volumétrico de 200 mL, onde foram misturados 50 mL de solução de KCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e 85 mL de solução de HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Ao final do trabalho o volume foi completado com água Milli Q para 200 mL. Semelhantemente o tampão pH 6,8 foi preparado em balão volumétrico de 200 mL, onde 50 mL de solução NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mol.L<sup>-1</sup> foi misturado a 22,4 mL de solução de NaOH 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e o volume completado com água de Milli Q para 200 mL (THE UNITED STATES PHARMCOPOEIA: USP 31, 2008).

Para preparo do sistema bifásico foram utilizados eppendorfs de 2 mL que receberam o volume de 500 µL da solução do fármaco em n-octanol. O volume da solução aquosa foi equivalente à metade (50%), ao dobro (200%) ou igual ao volume de n-octanol adicionado. O teste foi conduzido em duplicata para cada situação, gerando ao final do teste seis resultados.

Após mistura das fases o meio foi equilibrado por 1 hora a 37°C, seguido da agitação com revolução de 360° por 15 minutos. Após este período o sistema foi centrifugado por cinco minutos a 4000 rpm para separação total das fases e em seguida novamente mantido a 37°C por uma hora. A partir de cada um dos eppendorfs foi recolhida amostra da solução aquosa e n-octanólica para doseamento do fármaco. Determinadas as respectivas concentrações, calculou-se o quociente entre a concentração do fármaco na fase octanólica e aquosa. O valor obtido foi novamente submetido à operação matemática com cálculo do logaritmo da base 10 para determinação do valor nominal de LOG P.

#### 2.3.4. Metodologia para a determinação da absorvidade molar

Para o estudo de absorvidade molar dos fármacos nos solventes selecionados foram preparadas soluções em diferentes concentrações. As concentrações foram de 5, 10, 20 e 30 µg.mL<sup>-1</sup> em triplicata. Para construção da curva de absorvidade molar apenas os resultados de leitura da solução a 10 µg.mL<sup>-1</sup> foram considerados. Após aplicação da derivação de primeira ordem sobre o perfil de absorbância na janela espectral de 200 a 300 nm, selecionaram-se os picos encontrados e os valores de comprimento de onda. Com a seleção destes valores de comprimento de onda específicos, organizou-se uma tabela onde foram inseridos os principais resultados e para cálculo desta absorvidade as leituras das 12 amostras foram consideradas.

#### 2.3.5. Metodologia para solubilidade de fase para a interação fármaco/β-CD

Estudos de solubilidade de fase foram conduzidos conforme método descrito por HIGUCHI & CONNORS (1965) que considera o efeito de um agente solubilizante, no caso a β-ciclodextrina, sobre a solubilidade do fármaco em questão. Sumariamente uma quantidade constante do fármaco, suficiente para formação de corpo de fundo no recipiente de trabalho, é adicionada a soluções de diferentes concentrações da ciclodextrina. A mistura obtida é mantida sob agitação a temperatura constante por 48 horas até que se estabeleça o equilíbrio entre as fases. Após as 48 horas, a suspensão é filtrada em filtro de acetato de celulose e 0,45 µm para separação e obtenção da solução a ser analisada conforme método analítico específico descrito em 2.3.2. De posse dos dados de concentração do fármaco em função de diferentes concentrações de ciclodextrina, constrói-se gráfico e a partir das curvas observadas faz-se a classificação das mesmas.

Neste trabalho foram preparadas soluções de β-ciclodextrina com concentrações na faixa de 0,0008 a 0,016 mol.L<sup>-1</sup>. Em seguida foram adicionados 10 mg do fármaco em cada um das soluções, mantendo-as sob agitação a 25°C±0,5°C, 30°C±0,5°C ou 37°C±0,5°C em banho termostático por 48 horas. A seguir, as amostras foram filtradas em filtros de 0,45 µm para remoção do material



precipitado e na solução obtida o fármaco em estudo foi doseado conforme metodologia descrita no item 2.3.

### 2.3.6. Preparação dos complexos

Complexos entre os fármacos e  $\beta$ -ciclodextrina foram obtidos por técnicas distintas considerando a proporção molar de 1:1.

#### 2.3.6.1. Método da pasta

Para o preparo dos complexos pelo método da pasta pesou-se 200 mg de  $\beta$ -ciclodextrina que foi transferida para o gral de vidro juntamente com um dos fármacos. A massa de valsartan adicionada foi de 77 mg, da sinvastatina 74 mg e da lovastatina 72 mg. Em seguida, fez-se homogeneização do fármaco e da  $\beta$ -ciclodextrina. Sobre esta mistura adicionou-se 1 mL de água e a pasta obtida foi misturada por 45 minutos no gral de vidro. Após este período o material foi seco em estufa com recirculação de ar, a 40°C, por 24 horas para evaporação da água. Após evaporação o material foi armazenado a 4°C.

#### 2.3.6.2. Método da dispersão sólida

Complexos preparados pela técnica de dispersão sólida também foram obtidos para todos os fármacos. Inicialmente fez-se solubilização da  $\beta$ -ciclodextrina em água, na concentração de 16,67 mg.mL<sup>-1</sup>, de forma a obter-se 200 mg em 12 mL de solução, próximo ao limite de saturação de 18,0 mg.mL<sup>-1</sup>. A massa do valsartan pesada foi de 77 mg que posteriormente foi solubilizada em 1 mL de álcool etílico absoluto. Esta solução foi adicionada sobre a solução de  $\beta$ -ciclodextrina para permitir a complexação do fármaco. Imediatamente após adição da solução etanólica houve precipitação no meio com turvação do sistema. Esta suspensão foi mantida em banho com ultra-som por 10 minutos. A mesma suspensão foi congelada e liofilizada por 24 horas. O pó recolhido foi armazenado a 4°C.

Para preparo dos complexos com sinvastatina e lovastatina a técnica de dispersão sólida foi idêntica alterando-se apenas a massa dos fármacos que foi, respectivamente, de 74 mg e 72 mg. O volume de álcool etílico empregado para solubilização dos fármacos foi de 1 mL para a sinvastatina e de 5 mL para a lovastatina.

#### 2.3.6.3. Método da liofilização

A outra técnica selecionada para preparação dos complexos foi a de liofilização. Esta metodologia foi conduzida apenas para o valsartan, pois a lovastatina e a sinvastatina não

apresentam solubilidade significativa em água, solução ácida ou alcalina que viabilizasse a condução do método.

Inicialmente 77 mg de valsartan foram dispersos em água e a suspensão obtida teve seu pH corrigido com hidróxido de potássio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  para 6,0. Nestas condições o fármaco é solúvel visto que se trata de um ácido fraco de pKa 4,73. A solução de valsartan foi misturada a 12 mL de solução contendo 200 mg de  $\beta$ -ciclodextrina. Esta mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente a solução foi liofilizada e o pó obtido armazenado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.6.4. Mistura física

Para controle da complexação dos fármacos com a  $\beta$ -ciclodextrina pelas técnicas citadas foi feito também 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 unidos dentro de eppendorf de 2,0 mL e agitados vigorosamente.

#### 2.3.7. Dissolução intrínseca

O estudo para determinação da dissolução intrínseca foi baseado no método geral <1087> da USP 31 (THE UNITED STATES, 2008). O ensaio de dissolução foi conduzido sob condições *sink* empregando 900 mL de tampão fosfato ( $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pH 6,8, mantido a  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  a 100 rpm. O teste foi realizado em triplicata.

Para execução dos testes foram preparados discos de 8 mm usando prensa hidráulica Perkin Elmer (Massachusetts, IL, EUA). Estes discos são obtidos por aplicação de força igual a três toneladas por um minuto sobre 200 mg de amostra. Os produtos testados foram os complexos  $\beta$ -CD:VAL (obtidos por dispersão sólida ou liofilização) e VAL. 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 o complexo obtido por liofilização a amostragem se deu a cada 5 minutos até completar 20 minutos de teste. Para o complexo preparado por dispersão sólida e o VAL a amostragem se deu a cada 15 minutos pelo período de 60 minutos. A solução obtida em cada uma das cubas de dissolução foi filtrada utilizando filtro  $0,45 \mu\text{m}$ . Posteriormente as amostras foram diluídas em NaOH  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e analisadas conforme metodologia descrita para o valsartan no item 2.3.2.1 (p.23).

Os dados de concentração de VAL em função do tempo deram origem a um gráfico que permite 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  $\text{mg.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ .

### 2.3.8. Ação antagonista do complexo VAL:β-CD no efeito pressor da angiotensina II utilizando o método de Telemetria.

O efeito antagonista do valsartan e do complexo VAL:β-CD na ação pressórica da angiotensina II foi realizado em ratos Wistar machos, pesando entre 400 - 450 gramas, idade entre 16-18 semanas, pressão arterial média de 121 mmHg  $\pm$  8,7, provenientes do Cebio (Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais). O presente teste foi realizado no laboratório de hipertensão coordenado pelo professor Robson Santos do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente em um ciclo de 12/12 horas (dia/noite) e posteriormente anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1 mL/100 g de peso corporal) e preparados para cirurgia, onde cateter-transdutor foi inserido na artéria femoral para medida da pressão sanguínea. Após término da anestesia, os ratos foram alojados em gaiolas separadas, sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada (luz: 6:00 h às 18:00 h). Todos os ratos Wistar participantes do estudo receberam infusão sub-cutânea de Ang II (5  $\mu$ g.h<sup>-1</sup>) durante todo o experimento para indução do quadro hipertensivo. Neste período a pressão arterial média dos animais chegou a 165 mmHg  $\pm$  13,1. Antes dos experimentos, os animais foram submetidos à aclimatação, por período de 7 dias em uma sala isolada para condução da telemetria. O sistema de telemetria (Dados Sciences International, MN) foi utilizado para medir a pressão arterial média (PAM). Este sistema de acompanhamento é constituído por um transdutor de rádio frequência modelo TA11-PA C40, um receptor, uma matriz e um computador para registro de dados compatíveis com o respectivo software (Dataquest ARTE Gold 2.0) capaz de armazenar e analisar os dados. Antes do experimento, os ratos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos isolados por 10 a 12 dias antes do experimento.

Após este período os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: (a) grupo controle (n = 6), (b) VAL (n = 4); (c) VAL:β-CD (n = 4). Os animais do grupo (a) receberam água por gavagem, os do grupo (b) receberam VAL 1,14 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal e (c) VAL:β-CD 4,22 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal equivalente a 1,14 mg.kg<sup>-1</sup> de VAL.

O acompanhamento da pressão arterial consistiu primeiramente num período de 72 h, denominado com o período controle (CT), seguido da observação da pressão arterial por mais 15 dias após a administração oral das amostras. Os dados foram coletados a cada 10 minutos durante todo o período experimental. Os dados foram analisados usando o programa Prism v.5 e foram considerados como significativos quando p<0,05.



### 3.1. Caracterização dos fármacos

Os fármacos foram caracterizados por técnicas físico-químicas incluindo determinação do ponto de fusão, coeficiente de partição óleo/água (LOG P) análise elementar (CHN), análise térmica (TG/DTG, DSC), espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IR) e Ultravioleta (UV), difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN), desvio da luz polarizada e granulometria do pó.

#### 3.1.1. Valsartan

O valsartan é um fármaco de fórmula mínima  $C_{24}H_{29}N_5O_5$  com massa molar de  $435,53 \text{ g.mol}^{-1}$ , apresentando-se como um pó branco e inodoro. Com relação à sua solubilidade é considerado como sendo livremente solúvel em metanol, solúvel em clorofórmio e insolúvel em água. O ponto de fusão descrito é de  $116 - 117^\circ\text{C}$  (INDEX MERCK, 2000; MOFFAT et al.; 2003). Este fármaco é um anti-hipertensivo da categoria dos antagonistas dos receptores AT1 apresentando a fórmula estrutural abaixo (Figura 3.1).

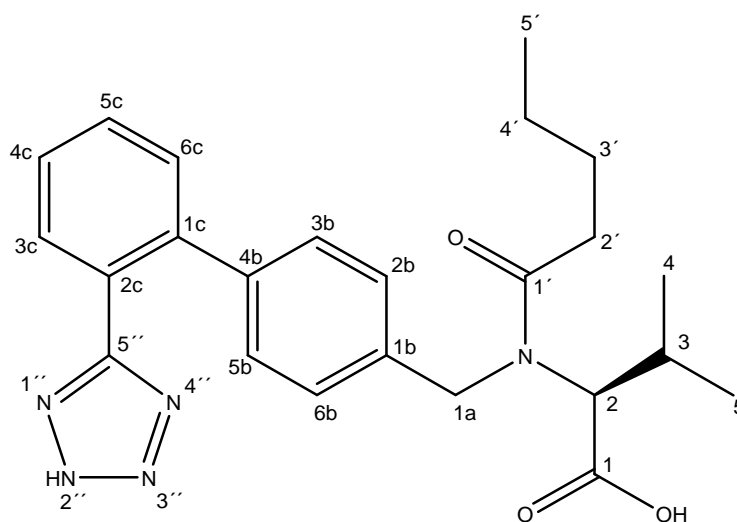


Figura 3.1: VAL ou 3-metil-2-[pentanoil-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil] fenil] metil] amino]-ácido butanóico - (IUPAC) [número de registro: 137862-53-4]

#### 3.1.1.1. Solubilidade e LOG P

A solubilidade do valsartan em água foi determinada em três diferentes temperaturas,  $25^\circ$ ,  $30^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ . Preparou-se solução saturada do fármaco que foi filtrada em filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  exatamente antes da análise. O doseamento do fármaco foi conduzido em espectrofotômetro ajustado para leituras no comprimento de onda de  $225 \text{ nm}$ . Os dados de solubilidade estão apresentados na Tabela 3.1 (p.31).

Tabela 3.1. Solubilidade do valsartan em água nas temperaturas de 25°, 30° e 37°C\*

Temperatura	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> ) (± CV)	Concentração (mol.L <sup>-1</sup> ) (± CV)
25°C	190,28 (± 4,8%)	4,20x10 <sup>-4</sup> (± 4,8%)
30°C	214,40 (± 4,5%)	4,73x10 <sup>-4</sup> (± 4,5%)
37°C	264,90 (± 8,4%)	5,84x10 <sup>-4</sup> (± 8,4%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. <sup>a</sup> CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

A solubilidade dos fármacos em água é uma variável importante, pois está relacionada à biodisponibilidade dos mesmos. Para ácidos e bases fracas, com capacidade de ionização em função do pH, a absorção aconteceria preferencialmente no estômago e intestino respectivamente. Mesmo ionizado o ácido fraco é mais extensamente absorvido no intestino em função do tempo de permanência do mesmo naquela região. Tudo isso vale para fármacos que se ionizam dependendo do pH do meio. Para os que não ionizam sua solubilidade é determinante e para calculá-la devemos considerar o coeficiente de partição óleo/água ou LOG P (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

O valsartan é um ácido fraco de pKa 4,73 que apresenta proporções distintas de ionização em função do pH (CACIGAL et al., 2001). Proporcionalmente quanto maior o pH maior sua solubilidade em água. A previsão da porcentagem de ionização do valsartan em diferentes pHs pode ser calculada pela equação 3.1 de Henderson-Hasselbach. O perfil de solubilidade do valsartan em função do pH foi proposto na Figura 3.2.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Equação 3.1

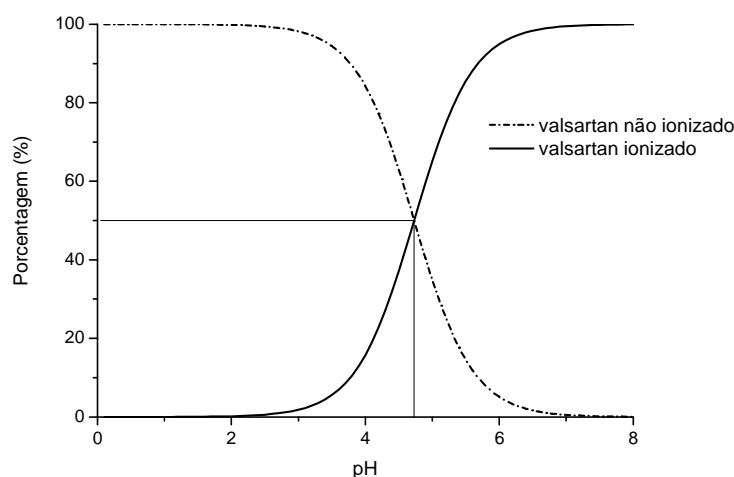


Figura 3.2. Variação na porcentagem de valsartan ionizado e não ionizado em função do pH da solução aquosa.

Os estudos de coeficiente de partição óleo/água para o valsartan consideraram condições específicas por se tratar de um fármaco passível de ionização dependendo do pH do meio. Dessa forma fez-se a substituição da água, frequentemente empregada no teste, por tampões que simulassem o pH estomacal (pH = 1,2) e intestinal (pH = 6,8) (THE UNITED STATES PHARMCPOEIA: USP 31, 2008). Os dados para LOG P do valsartan estão representados na Tabela 3.2. Informações da bibliografia indicam que o valsartan apresenta LOG P de 4,57 considerando a água como meio de estudo (TSRL INC, 2010). Este parâmetro juntamente com o dado de solubilidade em água é referência para classificação da molécula em um dos grupos propostos para a classificação biofarmacêutica dos fármacos. Segundo a BCS (TSRL INC, 2010) o valsartan está incluindo na Classe II entendido como aqueles que apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade. Para categorizá-lo neste grupo sua solubilidade deve ser inferior a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou a maior dose disponível do fármaco insolúvel no TGI. Nos estudos realizados, a solubilidade mostrou-se maior que este valor em todas as temperaturas de trabalho. Dessa forma o valsartan poderia deixar a Classe II e passaria a compor o grupo daqueles que tem alta solubilidade, ou seja, Classe I ou III. Segundo Wu & Benet (2005) o valsartan participa da Classe III, ou seja, aqueles que têm alta solubilidade e baixa permeabilidade, confirmando a reduzida biodisponibilidade deste fármaco quando administrado por via oral.

Tabela 3.2. Valores de LOG P para o valsartan em pH 1,2 e 6,8\*

pH = 1,2 (fluido estomacal)	pH = 6,8 (fluido intestinal)
2,35	- 0,52

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 6

Os valores encontrados para LOG P nos diferentes pHs de estudo confirmam a predominância da forma ionizada em pH = 6,8 favorecendo a concentração do fármaco na fase aquosa do estudo. Na condição de pH = 1,2 onde a ionização do fármaco foi suprimida, observou-se que o valsartan assumiu maior caráter lipofílico deslocando-se para a fase n-octanólica. A partir destas informações e dos dados disponíveis, pode-se perceber que na porção intestinal o valsartan seria encontrado preferencialmente na forma ionizada e mais solúvel. Já no estômago sua solubilidade seria reduzida em função de sua protonação. Conforme as diretrizes para classificação biofarmacêutica de substâncias, já que a dissolução do valsartan é favorecida apenas em pH = 6,8, o mesmo passa a ser incluído na Classe II, onde a biodisponibilidade é dependente da dissolução no TGI.

### 3.1.1.2. Ponto de fusão

O ponto de fusão do valsartan utilizado na preparação de formulações com  $\beta$ -ciclodextrina foi de  $100,5^{\circ}\text{C}$ , enquanto que dados da literatura indicam ponto de fusão de  $116 - 117^{\circ}\text{C}$ , cristalizado em

diisopropileter (INDEX MERCK, 2000), sugerindo a existência de formas polimórficas distintas para o valsartan com diferentes pontos de fusão.

Marti (2005) determinou o ponto de fusão do valsartan empregando DSC e observou que empregando o cadinho fechado o fármaco fundia entre 80 e 90°C. Nos casos onde o cadinho esteve aberto durante a operação o valsartan fundiu entre 105 e 110°C.

### 3.1.1.3. Análise elementar

A Tabela 3.3 mostra os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para o valsartan conforme apresentado no Index Merck (2000). Os valores obtidos com o estudo prático estão de acordo com os dados teóricos, permitindo identificação da matéria-prima.

Tabela 3.3. Resultados de CHN para o valsartan\*

	Porcentagem calculada		Porcentagem experimental ( $\pm$ CV)	
	$C_{24}H_{29}N_5O_5$	C	66,19%	C
	H	6,71%	H	6,86% ( $\pm$ 3,40%)
	N	16,08%	N	16,03% ( $\pm$ 1,99%)
	O	11,02%	O	ND <sup>b</sup>

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

<sup>b</sup>ND: não determinado em função da limitação da técnica.

### 3.1.1.4. Desvio da luz polarizada

O desvio da luz polarizada foi avaliado para o valsartan a 25°C, dissolvido em metanol na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> foi de + 61,6°  $\pm$  2,1%. Marti (2005) encontrou a 20°C e na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol um  $[\alpha]_D = + 70^\circ \pm 0,2$ . Os dados sugerem que a matéria-prima se trata do valsartan.

### 3.1.1.5. Granulometria

A granulometria do valsartan foi determinada por espalhamento de luz e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3.4 (p.34). O valor de d10 foi de 10,929  $\mu$ m, ou seja, 10% das partículas são menores que 10,929  $\mu$ m e 90% maiores que este valor. O mesmo é válido para o valor d90 de 71,844  $\mu$ m, onde 90% das partículas são menores que 71,844  $\mu$ m e 10% maior que este valor. O valor de d50 igual a 30,326  $\mu$ m indica que este é o tamanho médio das partículas e indica também o valor onde a curva de Gauss pode ser dividida em partes iguais. A Figura 3.3 (p.34) representa o perfil de distribuição das partículas caracterizado como monomodal seguindo o modelo gaussiano não deslocado.



A avaliação do perfil de distribuição de partículas do pó permite inferir que o produto não apresenta granulometria reduzida o suficiente compatível com os requisitos de um fármaco que apresenta problemas de dissolução no TGI. Embora o produto apresente-se uniforme, a granulometria pode ser menor favorecendo assim a dissolução do fármaco. Conforme Hintz & Johnson (1989) melhor seria a biodisponibilidade se menor fosse a partícula. Fármacos pertencentes à classe biofarmacêutica II se utilizados na forma nanoparticulada teriam maiores chances de dissolução e maior biodisponibilidade oral (JINNO et al., 2006; KIN et al., 2008).

Tabela 3.4. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica do valsartan\*

d10 (± CV)	d50 (± CV)	d90 (± CV)
10,929 µm (± 7,8%)	30,326 µm (± 8,0%)	71,844 µm (± 2,9%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

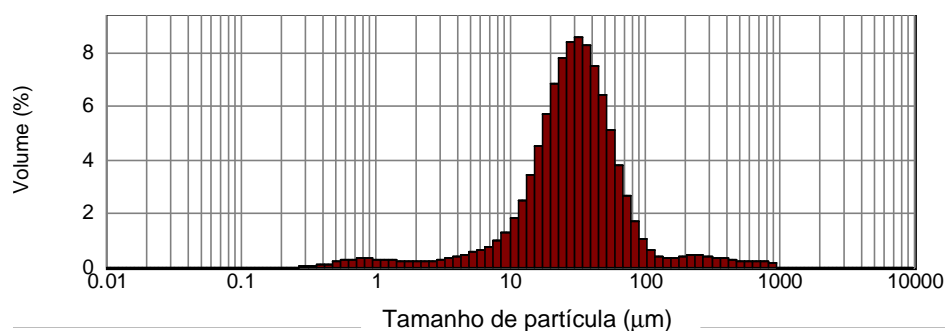


Figura 3.3. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima valsartan

### 3.1.1.6. Absortividade molar

A absortividade molar ( $\epsilon$ ) de substâncias é uma grandeza característica de cada espécie em questão, cuja magnitude está diretamente relacionada ao comprimento de onda da radiação incidente. O valor da absortividade de uma espécie é dado em  $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  e é calculado pela fórmula  $A = \epsilon.b.c$ , onde “A” é a absorbância, “ $\epsilon$ ” é a absortividade molar, “b” o caminho ótico ou a distância percorrida pelo feixe através da amostra e “c” a concentração molar da substância em análise (ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

A absortividade molar do valsartan na região do ultravioleta está apresentada na Figura 3.4 (p.35). Foram selecionados quatro solventes de interesse farmacêutico, sendo a água, o ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e o hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  solventes de grande interesse físico-químico, pois são frequentemente empregados em metodologias e testes *in vitro* para determinação da desintegração e dissolução de formas farmacêuticas contendo valsartan. Embora o metanol não seja um solvente farmacêutico foi selecionado por proporcionar fácil solubilização do valsartan. O perfil encontrado de absortividade molar em meio ácido é compatível com o modelo de absorbância descrito por Moffat e colaboradores (2003).

Na Tabela 3.5 estão apresentadas as absorptividades específicas para alguns comprimentos de onda na região do ultravioleta (UV). Esses comprimentos de onda foram escolhidos após aplicação da primeira derivada sobre o espectro UV e seleção dos picos encontrados nesta derivação de primeira ordem. Moffat e colaboradores (2003) apontam que o valsartan tem absorbância máxima em 203 e 248 nm. Todos estes dados referentes a perfis, absorbância e absorptividade corroboram a identificação da matéria-prima.

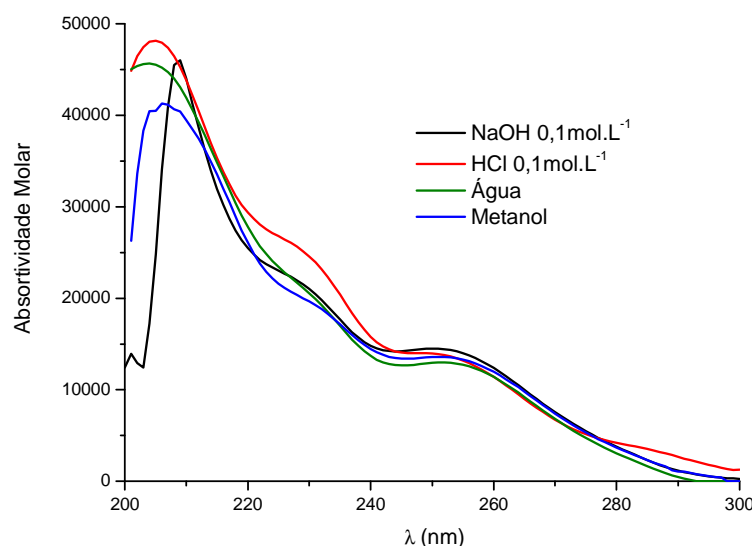


Figura 3.4. Perfil de absorptividade molar do valsartan na região de 200 nm a 300 nm em diferentes solventes. (O número de amostras foi igual a 3 para cada solvente).

Tabela 3.5. Absorptividade molar ( $\epsilon$ ) do valsartan em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta\*

	225 nm	234 nm	247 nm
Água	22838,5 ( $\pm$ 1,5%)	16992,5 ( $\pm$ 1,4%)	12806,9 ( $\pm$ 2,0%)
Metanol	21139,5 ( $\pm$ 1,0%)	17167,6 ( $\pm$ 0,5%)	13485,4 ( $\pm$ 0,5%)
HCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	26430,6 ( $\pm$ 2,0%)	20417,1 ( $\pm$ 2,1%)	13992,0 ( $\pm$ 2,0%)
NaOH 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	23029,5 ( $\pm$ 1,6%)	18393,1 ( $\pm$ 1,1%)	14352,2 ( $\pm$ 1,6%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 12.

### 3.1.1.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho

A Figura 3.5 (p.36) apresenta o espectro de Absorção na Região do Infravermelho para o valsartan e na Tabela 3.6 (p.36) a atribuição das principais bandas encontradas. Durante avaliação do espectro não foi identificada banda específica correspondente ao estiramento O-H do ácido carboxílico. Silverstein & Webster (1997) destacam que para os ácidos carboxílicos há possível formação de dímeros intermoleculares envolvendo duas carboxilas distintas. São estabelecidas ligações de hidrogênio intermoleculares viabilizando a formação de anéis de seis membros. A forte

ressonância faz com que a vibração de estiramento da hidroxila deixe de ser observada na região de  $3520\text{ cm}^{-1}$ .

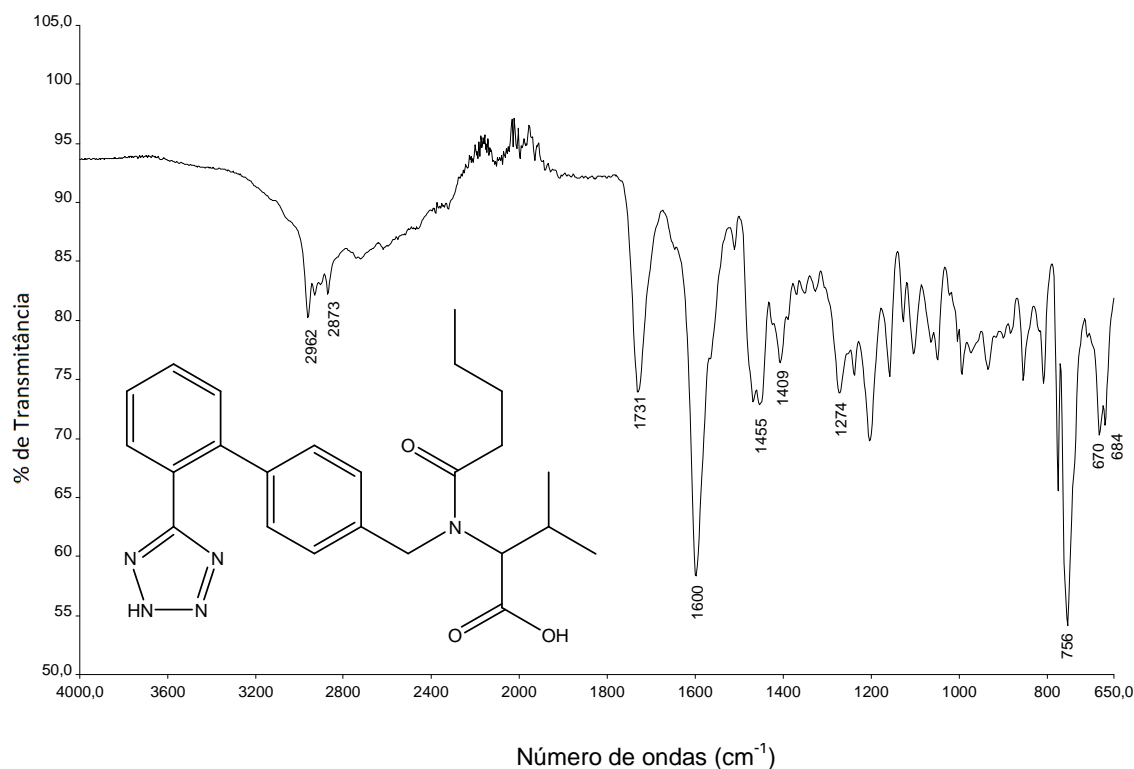


Figura 3.5. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para o valsartan.

Tabela 3.6. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para o valsartan

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições*
2962	Estiramento assimétrico C-H de $\text{CH}_2$ Estiramento assimétrico C-H de $\text{CH}_3$
2873	Estiramento simétrico C-H de $\text{CH}_2$ Estiramento simétrico C-H de $\text{CH}_3$
1731	Estiramento C=O de amida
1600	Estiramento C=O de ácido carboxílico
1455	Deformação assimétrica C-H de $\text{CH}_3$ Estiramento C=C de aromático
1409	Deformação simétrica tipo guarda-chuva C-H de $\text{CH}_3$
670, 684, 756	Deformação C-H de anel benzênico

\*SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. 1997

### 3.1.1.8. Análise térmica

A curva TG do valsartan (Figura 3.6, p.37) apresenta três eventos térmicos de decomposição do sólido. De acordo com os resultados observados o fármaco apresenta estabilidade térmica até

temperaturas próximas a 175°C sem perda significativa de massa. Após esta temperatura inicia-se a primeira decomposição com perda de 12,6% de massa e velocidade máxima de decomposição em 244°C. Posteriormente é observada a segunda perda de massa equivalente a 61%, começando em 313°C e terminando em 506°C. A velocidade máxima do evento ocorre em 416°C. A última perda de massa inicia-se em 506°C com término em 748°C, com velocidade máxima de ocorrência em 634°C. Neste evento a perda de massa equivale a 24%. Terminada a análise todo o material foi decomposto não gerando resíduo sólido.

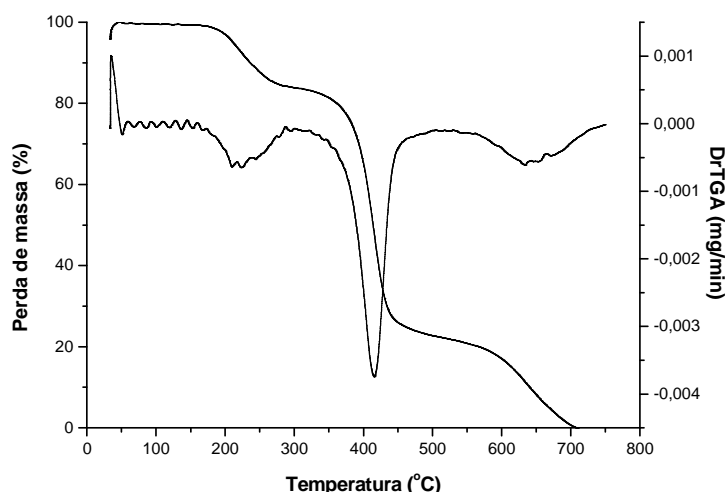


Figura 3.6. Curva TG e DTG para o valsartan obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

A curva DSC do valsartan é apresentada na Figura 3.7. A partir do perfil encontrado observa-se o pico endotérmico de fusão do valsartan em 100,5°C com T<sub>0</sub> (temperatura onset) em 92,6°C. Seguido ao pico de fusão, em temperaturas superiores a 150°C, verifica-se um processo exotérmico relacionado à termod decomposição da matéria-prima, conforme comprovado pela análise TG.

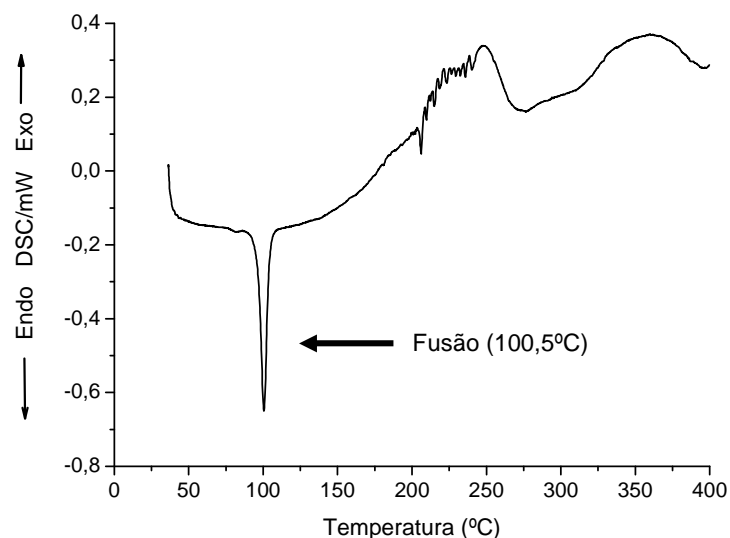


Figura 3.7. Curva DSC para o valsartan obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

A partir da avaliação da curva TG e DSC do valsartan pode-se perceber que a matéria-prima não contém umidade, o que seria caracterizado pela perda de massa em temperaturas próximas a 100°C na curva TG. Pela curva DSC foi caracterizado o ponto de fusão do fármaco em 100,5°C. Este valor para a fusão do fármaco está distante do dado descrito no Index Merck (2000) que é de 116-117°C (cristalizado em diisopropiléter), sugerindo que a amostra apresenta composição variada, incluindo material amorfo ou mesmo polimorfos. Observando a curva DSC percebe-se diferença de 7,9°C entre  $T_0$  (temperatura onset) e a temperatura de fusão do fármaco, sugerindo mais uma vez a baixa cristalinidade do pó (ROLLINGER, J. M. & BURGER, 2002).

### 3.1.1.9. Difratometria de raios-X em pó

A conformação das moléculas do valsartan e a orientação das mesmas alteram as propriedades físicas da matéria-prima influenciando tanto a manipulação do pó para produção de medicamentos quanto no efeito exercido *in vivo* pelo princípio ativo (RUKHMAN et al., 2005). O polimorfismo de um produto pode ser avaliado por determinação do ponto de fusão, análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear no estado sólido (NEWMAN & BYRN, 2003). Já a caracterização específica de um polimorfo pode ser feita principalmente por espectroscopia de raios-X.

O difratograma de raios-X de pó para o valsartan está representado na Figura 3.8 (p.39) e a Tabela 3.7 (p.39) mostra os ângulos de difração ( $2\theta$ ), a intensidade relativa dos picos ( $I/I_0$ ) e as distâncias interplanares ( $d$ ), obtidas a partir da Lei de Bragg, onde  $nK\alpha = 2d\text{Sen}\theta$ , na qual  $K\alpha = 1,5405$ .

O valsartan apresenta descritas treze formas polimórficas diferentes obtidas por diferentes técnicas de recristalização. Nestas técnicas empregaram-se solventes orgânicos diferentes, saturados e com cadeia carbônica variando de cinco a doze átomos. Outros solventes orgânicos também podem ser empregados como o etanol, dimetilformamida, acetona, metanol, isopropanol entre outros (RUKHMAN et al., 2005).

A análise do perfil cristalográfico do valsartan disponível para preparação dos complexos mostra semelhança deste com as formas polimórficas IX e X (RUKHMAN et al., 2005). A forma polimórfica IX é obtida a partir do aquecimento da forma polimórfica IV, onde é empregada a acetonitrila como solvente de recristalização. A transição da forma IV para a forma IX é conseguida quando se realiza a secagem do cristal, sob vácuo e temperatura entre 40 e 60°C, por pelo menos duas horas. Os picos mais característicos para a forma IX são 6,3°  $2\theta$ , 9,9°  $2\theta$ , 10,9°  $2\theta$ , 14,0°  $2\theta$ , 17,9°  $2\theta$  ( $\pm 0,2$ ), 18,9°  $2\theta$ , 20,4°  $2\theta$  (largo). Este pó apresenta cerca de 29,0% de cristalinidade. Já a forma polimórfica X é obtida pela recristalização do fármaco em acetato de n-butila. Esta forma polimórfica apresenta como característica principal pico em 5,6°  $2\theta$  ( $\pm 0,2$ ) e picos largos em 15,0°  $2\theta$

e  $20,6^\circ 2\theta$ . Esse valsartan recristalizado apresenta cerca de 16,5% de cristalinidade (RUKHMAN et al., 2005) sendo caracterizado como semicristalino.

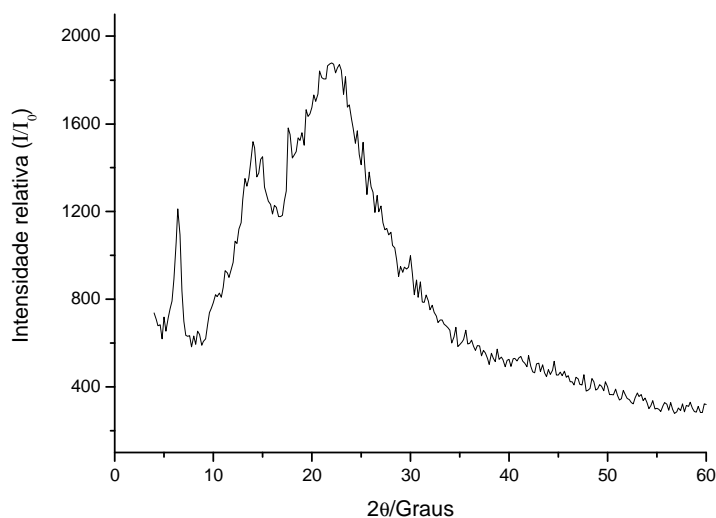


Figura 3.8. Difratograma de raios-X de pó do valsartan.

Tabela 3.7. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares ( $d$ ) do valsartan

$2\theta$ (Graus)	$I/I_0$ (%)	$d$ (Å)
6,4	64,6	15,3
14,0	80,8	7,0
15,0	77,3	6,6
17,6	84,2	5,6
19,0	83,1	5,2
20,8	98,0	4,7
22,0	100,0	4,5
23,4	96,6	4,2
25,2	80,7	3,9
27,0	65,3	3,7

A partir dos resultados de espectroscopia de raios-X foi possível caracterizar o valsartan como um pó semicristalino. Na condição de semicristalino pode-se dizer que o produto é composto tanto por porção cristalina como porção amorfa. A origem desta porção amorfa do pó pode ser distinta, dependendo da técnica de produção da matéria-prima, abordando principalmente o tipo de solvente empregado e velocidade de cristalização do pó, condições de temperatura, saturação do meio, dentre outras. Alguns processos são naturalmente capazes de proporcionar amorfização do pó, destacando a liofilização, *spray drying* e moagem (BAUER et al., 2001; BYRN et al., 2001; YU, 2001; NEWMAN & BYRN, 2003; SINGHAL & CURATOLO, 2004; HANCOCK, 2007; LI et al., 2007).

Caso o processo de produção inclua a técnica de liofilização, tem-se nesta técnica o congelamento rápido da amostra proporcionando redução da velocidade de movimentação molecular e elevação da viscosidade. Com a observação destes fenômenos físicos a molécula do fármaco não consegue se organizar e produzir um cristal, ou seja, dará origem a um produto proporcionalmente mais amorfo. Já no caso do *spray drying*, um líquido contendo o fármaco é atomizado na presença de uma corrente de ar que é capaz de promover a evaporação do solvente, com seguida solidificação do material não volátil. À medida que há secagem do líquido também é observada elevação da viscosidade da gotícula com formação final de um sólido preferencialmente amorfo. Por outro lado, durante um processo de moagem também pode ser observada amorfização de um pó. Basicamente, este sólido ao ser exposto a um mecanismo de moagem passa por um processo altamente energético que tem a capacidade de elevar a entropia do meio. A amorfização se dá quando a partícula sólida é rompida com simultânea elevação da temperatura e conseguinte amorfização da matéria-prima. Em todos estes casos, com geração de um produto amorfo, tem-se um sólido com maior mobilidade molecular, menor densidade e maior entropia e entalpia se comparados ao mesmo sólido na condição cristalina (BAUER et al., 2001; BYRN et al., 2001; YU, 2001; NEWMAN & BYRN, 2003; SINGHAL & CURATOLO, 2004; HANCOCK, 2007; LI et al., 2007).

A desorganização e aleatoriedade da disposição molecular característica dos produtos amorfos é interessante para o valsartan. Esta vantagem reside no fato de que uma vez pertencente à Classe Biofarmacêutica II, onde a biodisponibilidade é dependente da sua velocidade e taxa de dissolução, teríamos mais rápida dissolução do fármaco. Nos produtos amorfos observam-se menos interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio e força de van der Waals, o que facilitaria o desprendimento e mobilidade molecular favorecendo a solubilização (BAUER et al., 2001; BYRN et al., 2001; YU, 2001; NEWMAN & BYRN, 2003; SINGHAL & CURATOLO, 2004; HANCOCK, 2007; LI et al., 2007).

Se por um lado a amorfização de um pó pode elevar sua taxa de dissolução e velocidade de solubilização, por outro compromete significativamente sua estabilidade físico-química. Pós amorfos são mais susceptíveis à oxidação e hidrólise, e em função da capacidade intrínseca de absorção de água pode, graças à maior mobilidade molecular, chegar a uma condição de maior cristalinidade (BAUER et al., 2001; BYRN et al., 2001; YU, 2001; NEWMAN & BYRN, 2003; SINGHAL & CURATOLO, 2004; HANCOCK, 2007; LI et al., 2007).

#### 3.1.1.10. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma das ferramentas mais empregadas para caracterização de fármacos, tanto em solução como no estado sólido.

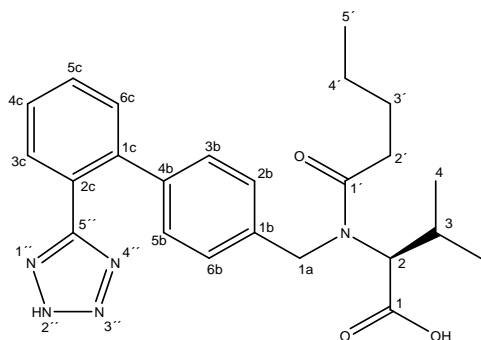
A análise do valsartan foi conduzida empregando técnicas unidimensionais e bidimensionais. As atribuições foram feitas com base nos dados obtidos através de RMN de  $^1\text{H}$ , mapa de contornos COSY (27°C e 107°C), mapa de contornos HMQC (27°C e 107°C), mapa de contornos HMBC

(107°C), subespectro DEPT 135 (27°C e 107°C) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (27°C e 107°C), sendo que o espectro de  $^1\text{H}$  foi obtido em diferentes temperaturas em função da duplicação de sinais observados, sugerindo a presença de diferentes conformeros para o VAL.

A atribuição dos sinais de ressonância foi feita a partir de um sinal do RMN de  $^1\text{H}$  com deslocamento químico estabelecido. Em seguida foi feita conexão com outros sinais de ressonância dos hidrogênios e carbonos da molécula. Na Figura 3.9 (p. 42) estão as seções do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o valsartan nas temperaturas de 27°, 37°, 47°, 57°, 67°, 77°, 87°, 97° e 107°C.

Com base nos dados obtidos em função dos experimentos em diferentes temperaturas, houve equilíbrio do conformero mais estável e redução no número de sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , possibilitando avaliar mais facilmente a simetria do sinal em questão, sua multiplicidade e deslocamento, garantindo assim elucidação do espectro do valsartan. Dentre os resultados encontrados foi na temperatura de 107°C que se alcançou maior estabilização viabilizando a análise e interpretação dos resultados. Os espectros unidimensionais e bidimensionais obtidos a 27°C foram importantes para avaliar de forma acessória sinais que deixaram de ser notados a 107°C. Todas as figuras referentes à caracterização por ressonância magnética nuclear estão apresentadas no anexo 1. Na temperatura de 107°C foi traçado o mapa de contornos COSY que é caracterizado por sugerir as correlações indicativas de acoplamento escalar entre átomos de hidrogênio. A Tabela 3.8 apresenta as principais correlações encontradas.

Tabela 3.8. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz) a 107°C para o valsartan, correlações observadas no mapa de contornos COSY



Hidrogênio	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade*	Correlação COSY
H2	4,151-4,434	sl	H3
H3	2,115-2,404	m	H2, H5, H4
H4	0,947	d	H3, H5
H5	0,759	d	H3, H4
H2'	2,115-2,404	m	H3'
H3'	1,414-1,568	sl	H2', H4'
H4'	1,254	m	H3', H5'
H5'	0,819	t	H4'

\*Legenda: sl = sinal largo, m = multipeto, t = tripleto, d = dupeto.



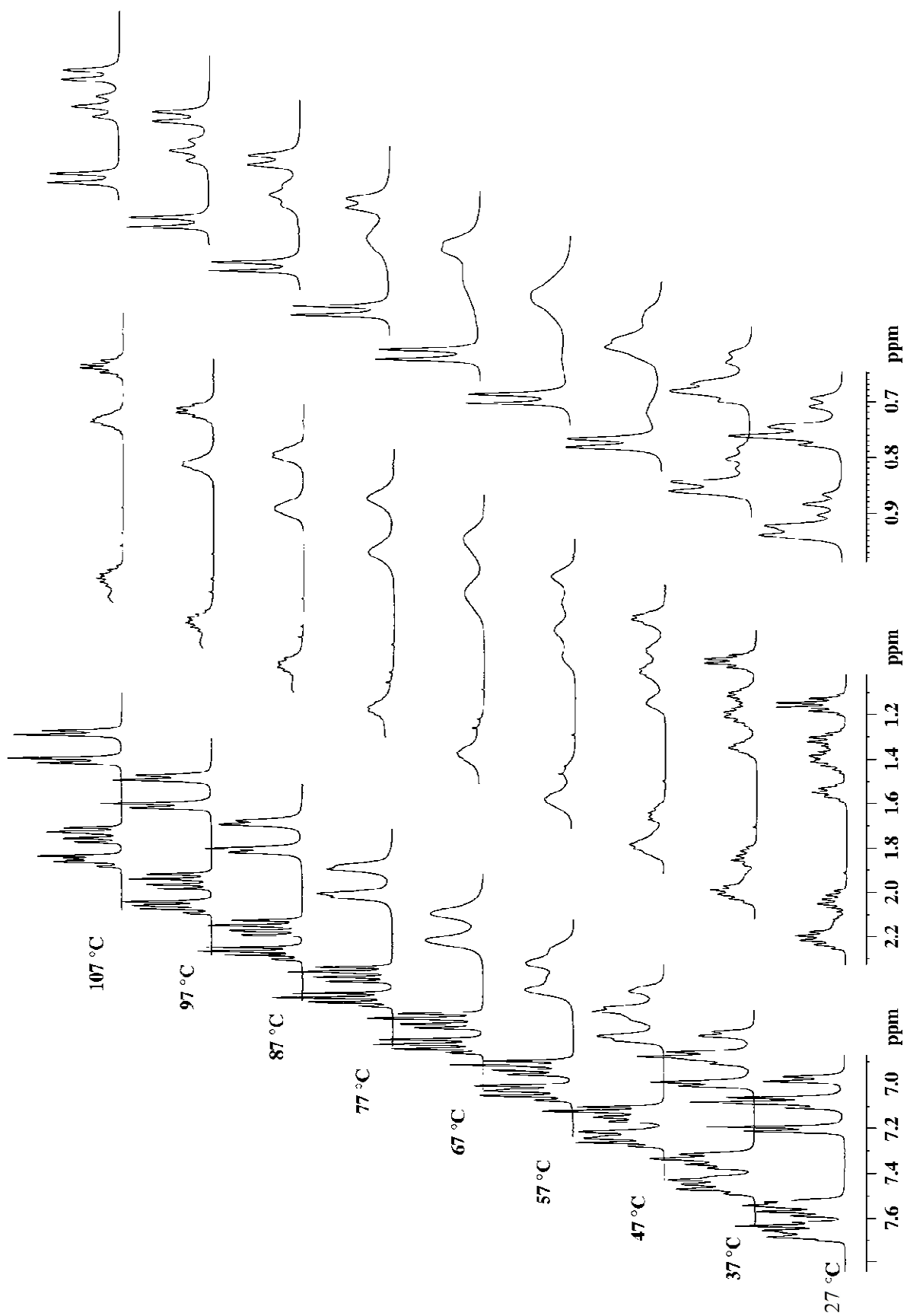


Figura 3.9. Seções do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o valsartan nas temperaturas de 27°, 37°, 47°, 57°, 67°, 77°, 87°, 97° e 107°C.

A atribuição dos sinais de ressonância de hidrogênio observados no espectro do valsartan a 107°C teve como ponto de partida a multiplicidade dos sinais para os hidrogênios H5, H4 e H5' e o valor de integração obtido para cada caso. A integração dos sinais mostra valor compatível com a presença de três hidrogênios correspondentes aos três grupos metila da molécula. A multiplicidade foi determinante para caracterizar o H5' que se apresentou como o único tripleto na região conciliável com o deslocamento destes hidrogênios. A partir de H5' foi feita atribuição dos hidrogênios H4', H3' e H2'. O maior deslocamento e desproteção do H4 estão relacionados possivelmente à conformação molecular do fármaco, inserindo este hidrogênio dentro do cone de desproteção (efeito anisotrópico) da carbonila presente no carbono C1. Assim sendo este grupo isopropila não apresentou deslocamentos idênticos para os hidrogênios em questão. Conhecendo-se o deslocamento destes hidrogênios H5 e H4 determina-se no mapa de contornos COSY a localização do hidrogênio H3 em  $\delta$  2,115 - 2,404 ppm. Definido o deslocamento do hidrogênio H3 o sinal do hidrogênio H2 é encontrado em  $\delta$  4,151 – 4,434 ppm.

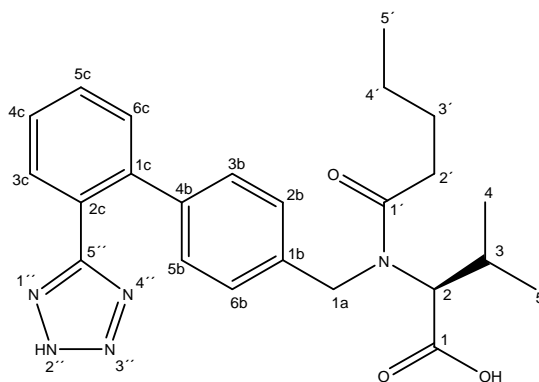
Após elucidação dos deslocamentos dos hidrogênios supracitados o espectro de ressonância de hidrogênio a 107°C apresenta apenas mais um sinal em  $\delta$  4,572 ppm e outros sinais na região acima de  $\delta$  7,000 ppm. Na região acima de 7,000 ppm localizam-se os hidrogênios dos anéis aromáticos "b" e "c" restando apenas o H1a a ser atribuído com deslocamento em  $\delta$  4,572 ppm. No mapa de contornos COSY o sinal em  $\delta$  4,572 ppm não apresenta correlação com nenhum outro hidrogênio, compatível com sua localização e nenhuma vizinhança na molécula do valsartan. Pelas seções expandidas este sinal apresenta-se como um simpleto largo na temperatura de 27°C e 37°C que se desdobra em dois dupletos a 107°C. Os dois hidrogênios H1a podem ser caracterizados então como diastereoisômeros em função da vizinhança, da multiplicidade e dos deslocamentos distintos de cada um destes hidrogênios. É importante ressaltar que o ponto de partida para toda a caracterização realizada até aqui se baseou na multiplicidade dos sinais, imperceptível à temperatura de 27°C, mas bem mais nítida na temperatura de 107°C.

Para caracterização dos deslocamentos dos hidrogênios dos anéis aromáticos a multiplicidade também foi determinante sendo que para o anel "b", pois teoricamente eram esperados apenas dupletos enquanto que para o anel "c" multipletos poderiam ser observados. Assim sendo, conforme esta multiplicidade os hidrogênios H2b, H3b, H5b e H6b localizam-se na região de  $\delta$  7,048 ppm e  $\delta$  7,172 ppm. Já os hidrogênios H3c, H4c, H5c e H6c estão presentes entre os deslocamentos de  $\delta$  7,490 ppm e  $\delta$  7,633 ppm. O hidrogênio da hidroxila ligada ao C1 foi identificada apenas no espectro de ressonância de hidrogênio obtido a 27°C com deslocamento de  $\delta$  8,300 ppm. Todos os deslocamentos foram determinados e estão apresentados na Tabela 3.9 (p.44).

A atribuição dos deslocamentos dos carbonos do valsartan apresentou-se mais complexa em função da duplicação de sinais a 27°C e associação ou desaparecimento de sinais a 107°C. Por isso para elucidação e atribuição dos sinais as duas temperaturas, 27°C e 107°C, foram trabalhadas juntamente com o espectro unidimensional  $^1\text{H}$ , subespectro DEPT 135 e bidimensionais como os mapas de contornos HMQC e HMBC.

Estão apresentados no anexo 1 os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135, mapa de contornos HMQC e HMBC para o valsartan em  $\text{DMSO-}d_6$  nas temperaturas de  $27^\circ\text{C}$  e  $107^\circ\text{C}$ .

Tabela 3.9. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento ( $J$ ) em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan a  $107^\circ\text{C}$



$^1\text{H}$	( $\delta$ ) (ppm)	M, IN*	$J$ (Hz)
2	4,151-4,434	sl, 2H	-
3	2,115-2,404 (sobrep. 2')	m, 3H	-
4	0,947	d, 3H	6,6
5	0,759	d, 3H	6,6
2'	2,115-2,404 (sobrep. 3)	m, 3H	-
3'	1,414-1,568	m, 2H	-
4'	1,254	sexteto, 2H	7,3
5'	0,819	t, 3H	7,0
1a	4,572	dd, 2H	48,0; 16,8
2b	7,050	d, 2H	7,7
3b	7,173	d, 2H	8,0
5b	7,173	d, 2H	8,0
6b	7,050	d, 2H	7,7
3c	7,572-7,674	m, 2H	-
4c	7,572-7,674	m, 2H	-
5c	7,456-7,569	m, 2H	8,0
6c	7,456-7,569	m, 2H	7,7
OH	8,300	s, 1H	-

\*Legenda: sl = sinal largo, m = multipeto, s = simpleto, d = dupeto, t = tripeto, dd = dupeto duplo, sobrep. = sobreposto

Baseando-se nos resultados apresentados puderam-se relacionar as principais correlações escalares ( $^nJ$ ) observadas no mapa de contornos HMBC. Os dados estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz) para o valsartan e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC

$^{13}\text{C}$	Tipo de carbono	$\delta$ (ppm)	HMBC		
			$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$	$^nJ_{\text{C-H}; n=4,5}$
1	C=O	173,165	-	-	-
2	CH	63,019	-	H4; H5	-
3	CH	27,274	H4; H5	-	-
4	CH <sub>3</sub>	19,377	-	H5	-
5	CH <sub>3</sub>	18,394	-	H4	-
1'	C=O	171,053	-	-	-
2'	CH <sub>2</sub>	32,153	-	-	-
3'	CH <sub>2</sub>	26,419	-	-	-
4'	CH <sub>2</sub>	21,178	-	-	-
5'	CH <sub>3</sub>	12,981	-	-	-
1a	CH <sub>2</sub>	48,484	-	-	-
1b	C	137,454	H2b; H6b	H3b; H5b	-
2b	CH	128,129	-	-	-
3b	CH	126,198	-	H5b	-
4b	C	137,454	H3b; H5b	H6c; H2b; H6b	H5c
5b	CH	126,198	-	H3b	-
6b	CH	128,129	-	-	-
1c	C	123,437	H6c	H5c	-
2c	C	140,992	H3c	H4c	-
3c	CH	129,972	H4c	-	-
4c	CH	129,972	H3c	-	-
5c	CH	126,991	H6c	-	-
6c	CH	130,262	-	-	-
5''	C	155,018	-	H3c	H4c

Diante dos estudos realizados pode-se afirmar que à temperatura ambiente e à temperatura corporal de 37°C, o valsartan apresenta mais de uma conformação espacial. A presença de isomeria conformacional foi nítida nos estudos de ressonância magnética nuclear, onde a variação da temperatura proporcionou estabilização de um rotâmero, o que viabilizou a atribuição de sinais no espectro de hidrogênio e carbono. O isomerismo conformacional trata da presença de confórmeros, que nada mais são que estereoisômeros não superponíveis capazes de interconverter-se a uma dada temperatura. Esta interconversão é tratada como a modificação espacial de uma mesma molécula devido à livre rotação de átomos. Estes isômeros conformacionais não podem ser separados devido à facilidade de interconversão de uma espécie em outra espécie (HARROLD, 1996; POTEKIN et al., 2002; RILEY et al., 2007).

A existência de confórmeros é relativamente comum já que muitas moléculas, dentre elas os fármacos, atendem aos critérios que viabilizam a isomeria conformacional. O critério que permite a flexibilização molecular depende da presença de ligação simples, não participante de anéis, onde um dos elementos participantes desta ligação simples não pode ter três substituintes idênticos, como hidrogênio, metilas, etc. (HARROLD, 1996; RILEY et al., 2007). A partir disso os átomos estariam livres para girar entorno dessa ligação simples.

A conformação assumida por uma molécula é parâmetro importante no que se refere a estudos de eficácia e segurança, determinando inclusive sua atividade farmacológica. Esta conformação é denominada como ativa, sendo capaz de interagir perfeitamente com um receptor ou uma enzima. A molécula do fármaco, quando encontrada na conformação ativa, apresenta disposição espacial ideal de maneira que todos os grupos envolvidos na ligação com o receptor ou enzima estão alocados de forma a garantir perfeita associação. É interessante ressaltar que nem sempre o confórmero mais ativo é necessariamente o mais estável energeticamente (HARROLD, 1996; RUKHMAN et al., 2005; RILEY et al., 2007).

Avaliando-se a estrutura molecular do valsartan é possível identificar ligações passíveis de rotação e também capazes de permitir a formação de confórmeros distintos. Li e colaboradores (2007) identificaram por estudos teórico-práticos que o valsartan apresenta dois confórmeros, caracterizados pela rotação entorno da ligação existente entre o nitrogênio e o carbono carbonílico C1'. Outras porções da molécula não apresentam a mesma liberdade impedindo assim a observação de outros confórmeros. A região aromática representada pelos três anéis da molécula (sistema bifenílico e anel tetrazólico na posição orto em relação ao anel "c") apresenta rigidez elevada o que inviabiliza a rotação nesta região. Outra situação interessante é o estabelecimento da ligação de hidrogênio intramolecular entre a carboxila e o anel tetrazólico do valsartan, inviabilizando mais uma vez a rotação nesta região. O número de confórmeros do valsartan é relativamente pequeno, embora se esperasse número elevado se consideradas todas as possibilidades de rotação da molécula. Isso se deve às barreiras energéticas envolvendo repulsões estérica e interações eletrônicas, capazes de permitir a observação de uma espécie energeticamente favorável, onde há minimização de interações

repulsivas e maximização de interações atrativas (HARROLD, 1996; POTEKIN et al., 2002; RILEY et al., 2007).

A presença de confórmeros para o valsartan foi observada por ressonância magnética nuclear, mas pode ser indiretamente avaliada por outras técnicas empregadas para caracterização do ativo. Por difração de raios-X percebeu-se a natureza semicristalina do fármaco, possivelmente pela dificuldade de cristalização do valsartan em função da isomeria conformacional, que compromete a ordenação e obtenção de um sólido organizado (BAUER et al., 2001; BYRN et al., 2001; YU, 2001; NEWMAN & BYRN, 2003; SINGHAL & CURATOLO, 2004; HANCOCK, 2007; LI et al., 2007).

### 3.1.2. Sinvastatina

A sinvastatina é um fármaco de fórmula mínima  $C_{25}H_{38}O_5$  com massa molar de  $418,57 \text{ g.mol}^{-1}$ , apresentando-se como um pó branco e inodoro. A sinvastatina é considerada como sendo praticamente insolúvel em água, muito solúvel em cloreto de metileno e facilmente solúvel em metanol e etanol. O ponto de fusão descrito para o fármaco é de  $135^\circ - 138^\circ\text{C}$ . A sinvastatina (Figura 3.10) é uma estatina empregada no tratamento de hiperlipidemias relacionada ao controle da síntese do colesterol pela inibição da atividade de enzima HMG-Coa redutase (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII, 2002; THE UNITED STATES PHARMCOPOEIA: USP 31, 2008)

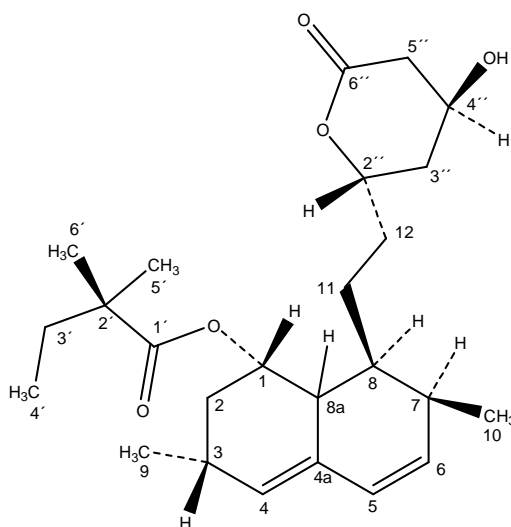


Figura 3.10. [8 - [2 - (4 - hidróxi - 6 - oxo - oxan - 2 il) etil] - 3, 7- dimetil - 1, 2, 3, 7, 8, 8a – hexa hidronaftaleno - 1 - il] 2, 2 - dimetilbutanoato (IUPAC) [número de registro: 79902-63-9]

#### 3.1.2.1. Solubilidade e LOG P

A solubilidade da sinvastatina em água foi determinada em três diferentes temperaturas,  $25^\circ$ ,  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}$ . Para todos os casos preparou-se solução saturada do fármaco que foi filtrada em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  antes da análise. O doseamento do fármaco foi conduzido em HPLC conforme metodologia da USP 31 (THE UNITED STATES PHARMCOPOEIA: USP 31, 2008). Os resultados de solubilidade estão apresentados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11. Solubilidade da sinvastatina em água nas temperaturas de  $25^\circ$ ,  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}^*$

Temperatura	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ( $\pm$ CV)	Concentração ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) ( $\pm$ CV)
$25^\circ\text{C}$	7,91 ( $\pm$ 3,8%)	$1,9 \times 10^{-5}$ ( $\pm$ 3,8%)
$30^\circ\text{C}$	10,69 ( $\pm$ 4,7%)	$2,6 \times 10^{-5}$ ( $\pm$ 4,7%)
$37^\circ\text{C}$	11,38 ( $\pm$ 3,9%)	$2,7 \times 10^{-5}$ ( $\pm$ 3,9%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

A solubilidade da sinvastatina em diferentes solventes, conforme dados bibliográficos, está apresentada na Tabela 3.12. Serajuddin (1991) encontrou que a solubilidade da sinvastatina em tampão pH 5,0 é de 1,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Tabela 3.12. Solubilidade da sinvastatina em diversos solventes (INDEX MERCK, 2000; MOFFAT, 2003)

Solvente*	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Concentração ( $\text{mol.L}^{-1}$ )
Clorofórmio	610	1,46
DMSO	540	1,29
Metanol	200	0,48
Etanol	160	0,38
n-hexano	0,15	$3,60 \times 10^{-4}$
HCl 0,1 $\text{mol.L}^{-1}$	0,06	$1,40 \times 10^{-4}$
PEG 400	70	0,17
Propilenoglicol	30	0,07
NaOH 0,1 $\text{mol.L}^{-1}$	70	0,17
Água	0,03	$7,00 \times 10^{-5}$

\*Legenda: PEG = Polietilenoglicol, DMSO = Dimetilsulfóxido

O estudo de coeficiente de partição óleo/água para a sinvastatina considerou a partição da mesma em água e n-octanol. Não foram escolhidos o fluido intestinal e estomacal visto que a sinvastatina não sofre ionização e dissolução pH dependente. O fármaco foi dissolvido em n-octanol na concentração de 0,01  $\text{mol.L}^{-1}$  e posteriormente misturado à água. Após período de equilíbrio a sinvastatina foi doseada nas duas fases. O LOG P da sinvastatina encontrado foi de  $4,5 \pm 4,0\%$ . Dados bibliográficos indicam LOG P para a sinvastatina igual a 4,68 (MOFFAT et al., 2003).

A caracterização da solubilidade da sinvastatina bem como do coeficiente de partição confirmam a reduzida solubilidade da mesma em água, corroborando sua inserção na Classe II da BCS. Essa dificuldade de dissolução em água justifica em parte sua biodisponibilidade de apenas 5% (FONSECA, 2005).

### 3.1.2.2. Ponto de fusão

O ponto de fusão da sinvastatina utilizada na preparação de formulações com  $\beta$ -ciclodextrina foi de 139,2°C, enquanto que dados da literatura indicam ponto de fusão de 135° - 138°C (INDEX MERCK, 2000; MOFFAT, 2003).

A avaliação do ponto de fusão de uma substância apresenta-se como uma das formas mais simples para identificação do polimorfismo ou amorfismo de uma matéria-prima. Graeser e colaboradores (2008) recristalizaram a sinvastatina em diferentes solventes e em diferentes



temperaturas conseguindo maior grau de amorfização do pó. Nas análises realizadas foi destacado que o ponto de fusão do produto mais cristalino foi de 139,17°C enquanto que os dois produtos mais amorfos produzidos tiveram ponto de fusão de 131,7°C e 133,7°C. Um dos problemas relatados foi que este pó amorfo apresenta tendência natural a alcançar o estado cristalino novamente. Quando mantidos a temperatura de 20°C alguns pós recuperaram o estado cristalino no período de vinte e quatro horas.

### 3.1.2.3. Análise elementar

A Tabela 3.13 mostra os teores de carbono e hidrogênio para a sinvastatina conforme apresentado no Index Merck (2000). Os valores obtidos com o estudo prático estão de acordo com os dados teóricos, sugerindo pureza da matéria-prima.

Tabela 3.13. Resultados de CHN para a sinvastatina\*

C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	Porcentagem calculada		Porcentagem experimental ± CV	
	C	71,74%	C	71,87%(± 0,03%)
H	9,15%	H	9,12% (± 0,78%)	
O	19,11%	O	ND	

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

### 3.1.2.4. Desvio da luz polarizada

O desvio da luz polarizada foi avaliado para a solução de sinvastatina em acetonitrila a 25°C e na concentração de 1% (p/v) foi de + 290° ± 0,1%. De acordo com a USP 31 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA: USP 31, 2008) o poder rotatório [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> da sinvastatina na concentração de 0,5% em acetonitrila situa-se entre + 285° e + 298°, enquanto que o Index Merck (2000) indica o valor específico de + 292° no mesmo solvente. A partir do resultado foi possível identificar a sinvastatina com a matéria-prima em estudo.

### 3.1.2.5. Granulometria

A granulometria da sinvastatina foi determinada por espalhamento de luz e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3.14 (p.51). O valor de d<sub>10</sub> foi de 2,544 µm, ou seja, 10% das partículas são menores que 2,544 µm e 90% maiores que este valor. O mesmo é válido para o valor d<sub>90</sub> de 26,630 µm, onde 90% das partículas são menores que 26,630 µm e 10% maior que este valor. O valor de d<sub>50</sub> igual a 8,846 µm indica que este é o tamanho médio das partículas e indica também o valor onde a curva de Gauss pode ser dividida em partes iguais. A Figura 3.11 (p.51)

representa o perfil de distribuição das partículas caracterizado como monomodal seguindo o modelo gaussiano não deslocado.

Tabela 3.14. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica da sinvastatina\*

d10 (± CV)	d50 (± CV)	d90 (± CV)
2,544 µm (± 0,1%)	8,846 µm (± 0,2%)	28,630 µm (± 0,6%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

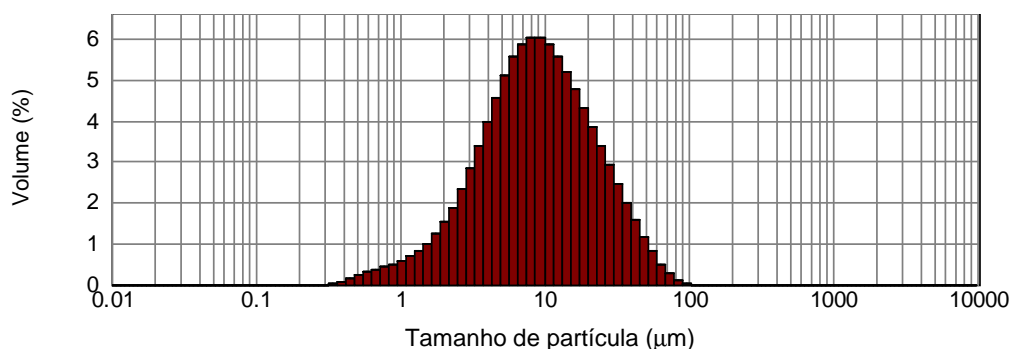


Figura 3.11. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima sinvastatina.

A granulometria da sinvastatina mostrou-se reduzida com média de tamanho equivalente a 8,846 µm. É interessante se trabalhar com pó fino por se tratar de um fármaco que apresenta dificuldade de dissolução, garantindo assim melhor velocidade de dissolução do mesmo. Embora a redução da granulometria favoreça a dissolução há conseguinte elevação da instabilidade química caracterizada pela elevação da velocidade de oxidação do fármaco. Esta oxidação frequentemente é minimizada pela associação de butil hidroxitolueno ou butil hidroxianisol que são misturados ao pó aumentando a estabilidade da sinvastatina (PFLAUM et al., 2006; ZHANG et al., 2008).

### 3.1.2.6. Absortividade molar

A absortividade molar da sinvastatina ( $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) em regiões do espectro ultravioleta, em nm, está apresentada na Figura 3.12 (p.52). Foram selecionados quatro solventes de interesse farmacêutico, sendo a água, o ácido clorídrico 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  e o hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  solventes de grande interesse físico-químico, pois são frequentemente empregados em metodologias e testes *in vitro* para determinação da desintegração e dissolução de formas farmacêuticas contendo sinvastatina. Embora o metanol não seja um solvente farmacêutico foi selecionado por proporcionar fácil solubilização da sinvastatina.

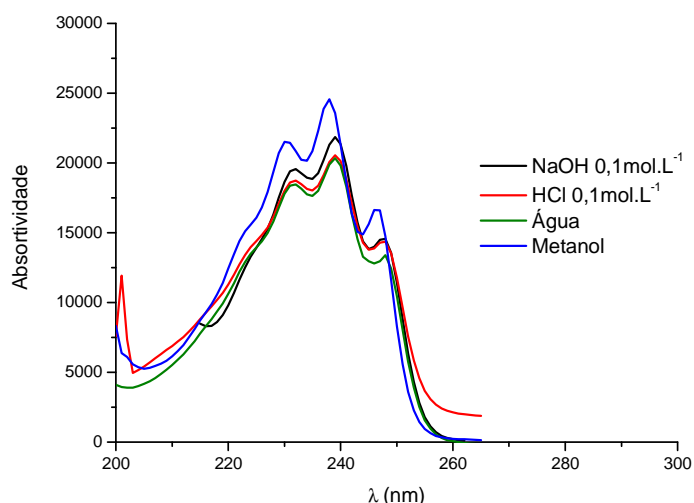


Figura 3.12. Perfil de absorção molar da sinvastatina na região de 200 nm a 300 nm em diferentes solventes (O número de amostras foi igual a 3 para cada solvente).

Na Tabela 3.15 estão apresentadas as absorções específicas para alguns comprimentos de onda na região do ultravioleta (UV). Estes comprimentos de onda foram escolhidos após aplicação da primeira derivada sobre o espectro UV e seleção dos picos encontrados nesta derivação de primeira ordem. Moffat (2003) indica que em meio básico os picos na derivação de primeira ordem da curva do espectro UV aparecem nos comprimentos de onda de 229, 238 e 246 nm, ou seja, os mesmos determinados no estudo prático realizado, sugerindo que a matéria-prima empregada foi corretamente identificada. Além da similaridade nos comprimentos de onda o perfil da curva de absorção na região do ultravioleta é análogo ao descrito na literatura. Já em acetonitrila a bibliografia indica que estes picos seriam observados em 231, 238 e 247 nm (MOFFAT, 2003).

Tabela 3.15. Absorção molar ( $\epsilon$ ) da sinvastatina em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta\*

	229 nm	238 nm	246 nm
Água	16962,4 ( $\pm$ 3,2%)	19096,7 ( $\pm$ 3,6%)	13513,1 ( $\pm$ 2,5%)
Metanol	20720,7 ( $\pm$ 3,5%)	23874,5 ( $\pm$ 2,9%)	16613,2 ( $\pm$ 3,7%)
HCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	17078,1 ( $\pm$ 1,4%)	19126,1 ( $\pm$ 1,5%)	13880,7 ( $\pm$ 2,9%)
NaOH 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	17508,0 ( $\pm$ 2,9%)	20211,8 ( $\pm$ 3,0%)	13986,8 ( $\pm$ 3,0%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 12.

### 3.1.2.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho

A Figura 3.13 apresenta o espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a sinvastatina e na Tabela 3.16 (p.54) a atribuição das principais bandas encontradas.

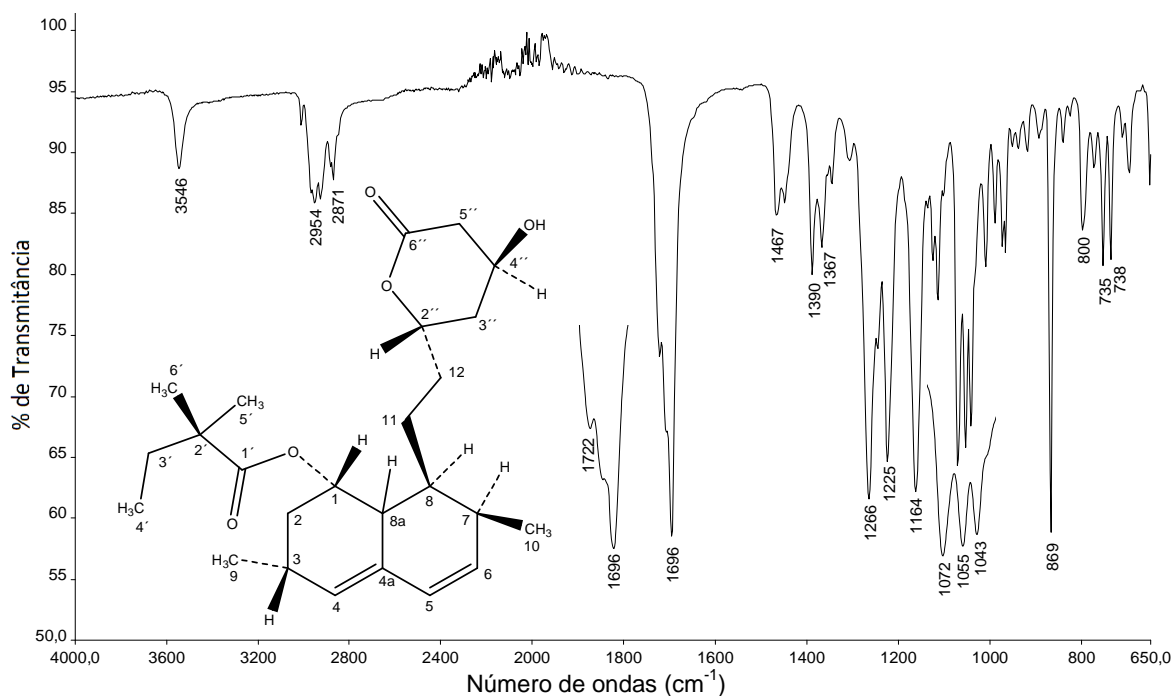


Figura 3.13. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a sinvastatina.

Dados indicam que os principais picos para a sinvastatina analisada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho seriam encontrados em 1718, 1459, 1389, 1267  $\text{cm}^{-1}$  (MOFFAT, 2003). Todos os sinais, com pequenas variações, foram identificados no espectro obtido para a sinvastatina.

GRAESER (2008) e CEJKA (2003) discutiram que a cristalinidade da sinvastatina pode ser caracterizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. A banda que diferencia a forma amorfa da forma cristalina é observada em 3546  $\text{cm}^{-1}$  sendo que se a banda se mostra aguda atribui-se que o fármaco é cristalino. Se a mesma banda apresenta-se alargada o produto é caracterizado como amorfo. A cristalinidade está diretamente relacionada à formação de ligações de hidrogênio intermolecular como proposto por Cejka (2003). Esta cristalinidade também foi identificada na caracterização do ponto de fusão e difração de raios-X.

Tabela 3.16. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para a sinvastatina

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições*
3546	Estiramento O-H de álcool Ligação de hidrogênio intermolecular **
2954	Estiramento simétrico C-H de CH <sub>2</sub> Estiramento simétrico C-H de CH <sub>3</sub>
2871	Estiramento assimétrico C-H de CH <sub>2</sub> Estiramento simétrico C-H de CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>
1722	Estiramento C=O de éster (C1')
1696	Estiramento C=O de éster (lactona - C6'')
1467	Deformação assimétrica de CH <sub>3</sub> tipo balanço Estiramento C=C
1390, 1367	Deformação CH <sub>3</sub> tipo guarda-chuva
1266	Deformação assimétrica C-O-C de lactona
1225	Deformação assimétrica C-O-C de éster
1072	Estiramento simétrico C-O-C de lactona
1055	Estiramento simétrico C-O-C de éster
1043	Estiramento C-OH de álcool secundário
869	Deformação C-H de alceno trissubstituído R <sub>1</sub> CH=CHR <sub>2</sub>
738	C-H fora do plano R <sub>2</sub> C=CHR
735	Deformação angular tipo "rocking" do grupo etila

\* SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. 1997

\*\* CEJKA et al., 2003

### 3.1.2.8. Análise térmica

A curva TG da sinvastatina (Figura 3.14, p.55) apresenta dois eventos térmicos de decomposição do sólido. De acordo com os resultados observados o fármaco apresenta estabilidade térmica até temperaturas próximas a 200°C sem perda significativa de massa. Após esta temperatura inicia-se a primeira decomposição com perda de massa equivalente a 93,1% onde a velocidade máxima de decomposição foi observada em 295°C. Posteriormente a segunda perda de massa equivalente a 6,9% é encontrada, começando em 462°C e terminando em 630°C. Terminada a análise todo o material foi decomposto não gerando resíduo sólido. Souza e colaboradores (2007) realizaram estudo térmico da sinvastatina em diferentes atmosferas, nitrogênio ou ar sintético, aplicando razões de aquecimento também diferentes. Nestes estudos a sinvastatina analisada sob condição de atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> apresentou um primeiro evento de decomposição iniciado em 203°C terminando em 376°C com perda de massa igual a

76,1%. Um segundo evento foi destacado começando em 376°C e terminando em 493°C correspondendo a 23,5% de perda de massa. Também não houve geração de resíduo sólido quando terminada a análise.

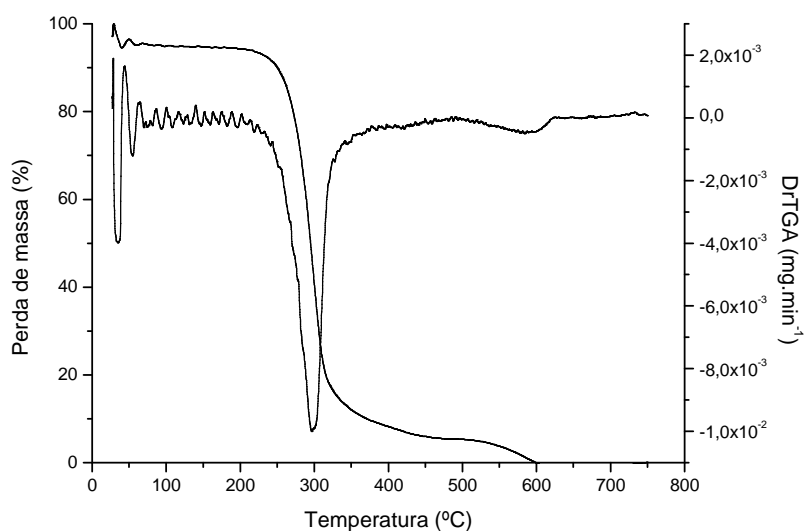


Figura 3.14. Curva TG e DTG para a sinvastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

A curva DSC da sinvastatina é apresentada na Figura 3.15. A partir do perfil encontrado observa-se o pico endotérmico de fusão da sinvastatina em 139,2°C com T<sub>0</sub> (temperatura onset) igual a 137°C (Fig. 3.15). Os dados obtidos estão de acordo com a literatura que destaca T<sub>0</sub> em 138°C e fusão em 142°C (SOUZA et al., 2007). O ponto de fusão encontrado é compatível com elevado grau de cristalinidade do fármaco conforme descrito por Graeser e colaboradores (2008).

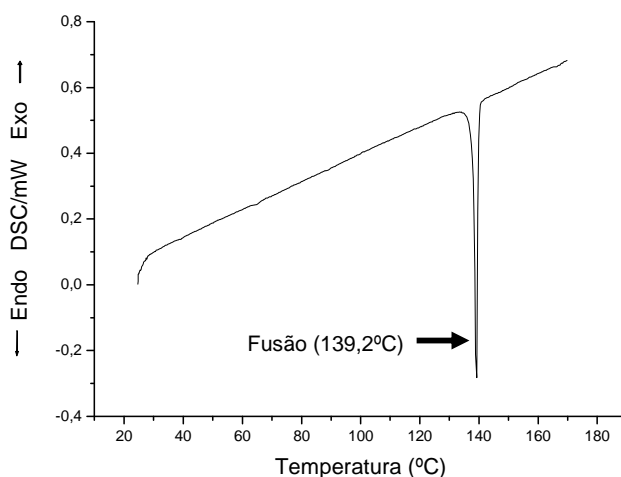


Figura 3.15. Perfil da curva DSC para a sinvastatina obtida sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

### 3.1.2.9. Difractometria de raios-X de pó

O difratograma de raios-X de pó para a sinvastatina está representado na Figura 3.16 e a Tabela 3.17 mostra os ângulos de difração ( $2\theta$ ), a intensidade relativa dos picos ( $I/I_0$ ) e as distâncias interplanares ( $d$ ), obtidas a partir da Lei de Bragg, onde  $nK\alpha=2d\text{Sen}\theta$ , na qual  $K\alpha=1,5405$ .

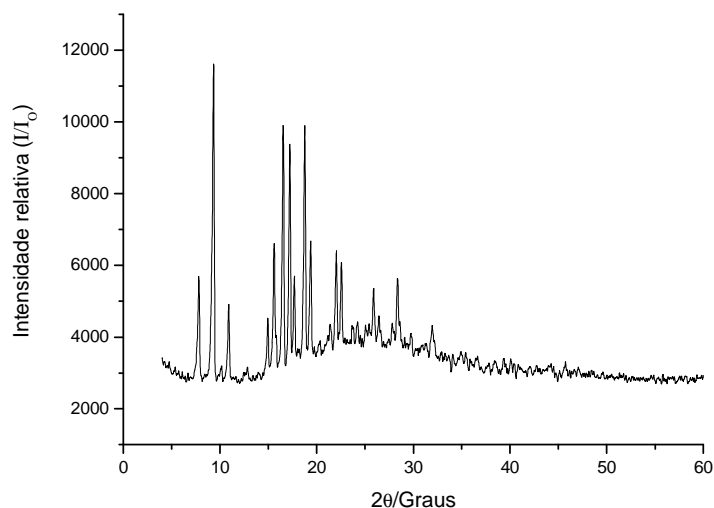


Figura 3.16. Difratograma de raios-X de pó da sinvastatina.

Tabela 3.17. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares ( $d$ ) da sinvastatina

$2\theta$ (Graus)	$I/I_0$ (%)	$d$ (Å)
7,8	49,0	12,6
9,3	100,0	10,5
15,6	56,9	6,3
16,5	85,2	6,0
17,2	80,7	5,7
18,8	85,2	5,2
22,0	55,1	4,5
22,6	52,3	4,4
25,9	46,1	3,8
28,4	48,5	3,5

O resultado da análise por raios-X da sinvastatina indica que a matéria-prima tem elevada cristalinidade. Este alto grau de cristalinidade compromete a dissolução do fármaco que por si só é considerado como praticamente insolúvel em água. As formas cristalinas apresentam menor entropia e energia livre e maior organização molecular implicando diretamente em maior requisição energética para sua solubilização. Comparativamente, as formas amorfas exibiriam frequentemente melhores

propriedades de dissolução em relação às cristalinas (SUNDARAM et al., 2006; GRAESER et al., 2008). Trabalhos descritos propõem exatamente romper esta organização molecular elevada da sinvastatina de maneira a proporcionar melhora da dissolução.

A sinvastatina é incluída na classe biofarmacêutica II tendo sua biodisponibilidade limitada pela dissolução (TSRL INC, 2009). Estudos e patentes mostram alternativas para contornar este problema de dissolução empregando-se formas amorfas da sinvastatina. Esta amorfização é capaz de contornar parcialmente os problemas de solubilização em água garantindo uma maior biodisponibilidade do fármaco. Esta elevação na biodisponibilidade permitiria redução de dose e minimização de efeitos adversos causados pelo fármaco (SUNDARAM et al., 2006; GRAESER et al., 2008). O problema encontrado relaciona-se ao rápido retorno à forma cristalina quando este fármaco é armazenado em condições de temperatura da ordem de 20°C e umidade relativa de 35%. Análises do pó após períodos variados de armazenamento indicaram a presença de sinais característicos de um produto cristalino em ângulos de difração ( $2\theta$ ) 9,3°, 10,7°, 19,2°, 22,4° (GRAESER et al., 2008).

#### 3.1.2.10. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear também foi empregada para caracterização da sinvastatina utilizando as técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ , mapa de contornos HMQC, mapa de contornos HMBC, subespectro DEPT 135 e RMN de  $^{13}\text{C}$ . A atribuição dos sinais foi realizada em paralelo aos estudos com a lovastatina já que as duas moléculas só se diferenciam pela presença de um grupo metila na posição 2' na molécula da sinvastatina e um hidrogênio na molécula da lovastatina. Dados publicados por LEE (2005) foram empregados para confirmar a atribuição proposta. Todas as figuras referentes ao estudo de ressonância magnética nuclear da sinvastatina estão apresentados no anexo 2.

Para atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da sinvastatina buscou-se caminho alternativo para o trabalho. Na região próxima ao tetrametilsilano encontram-se dois sinais, um duplete em  $\delta$  0,832 ppm e um tripleto em  $\delta$  0,769 ppm, ambos integrados com valor igual a três. Buscando na molécula da sinvastatina hidrogênios protegidos que poderiam apresentar tais sinais, chega-se à conclusão que os cinco hidrogênios metílicos da sinvastatina são relativamente distintos no que se refere à multiplicidade de sinais. Apenas o hidrogênio H4' pode ter como resultado um tripleto. Os hidrogênios H5' e H6' teriam simpleto como resultado e os hidrogênios H9 e H10 seriam dupletos. Caracteriza-se dessa forma os hidrogênios H4' com deslocamentos de  $\delta$  0,769 ppm (integral igual a três), e os hidrogênios H5' e H6', equivalentes, com deslocamento químico  $\delta$  1,058 ppm (integral igual a seis). No mapa de contornos HMQC encontram-se os carbonos C4' com deslocamento de  $\delta$  9,033 ppm e C5' e C6', sobrepostos, com deslocamento de  $\delta$  24,340 ppm e 24,380 ppm. A partir de H4' busca-se no mapa de contornos COSY acoplamento escalar permitindo a localização e atribuição do H3', um multiplete, com deslocamento  $\delta$  1,406-1,539 ppm. A integração deste multiplete é igual a dois e por HMQC localiza-se o carbono C3' em  $\delta$  32,409 ppm.



A localização do carbono C2' vem pelo mapa de contornos HMBC em função dos sinais de acoplamento de longa distância deste carbono em  $\delta$  42,316 ppm com os hidrogênios H3', H4', H5' e H6'. Além do carbono C2' que não apresenta hidrogênios ligados, há outros dois carbonos carbonílicos na molécula que podem ser identificados comparando-se os sinais suprimidos no mapa de contornos HMQC e espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135. Os sinais destes carbonos tem deslocamento de  $\delta$  176,506 ppm e  $\delta$  170,060 ppm. O deslocamento de ambos é compatível com referencial teórico sobre o deslocamento de carbonos carbonílicos de ésteres. Observa-se que o carbono em  $\delta$  176,506 ppm tem acoplamento de longa distância com os hidrogênios H3', H5' e H6' tratando-se então do carbono C1'. Por conseguinte o carbono em  $\delta$  170,060 ppm trata-se do C6''.

Este carbono C6'', pelo mapa de contornos HMBC, tem dois sinais de acoplamento com hidrogênios em  $\delta$  2,622 ppm e  $\delta$  2,247-2,447 ppm. Na integração do sinal em  $\delta$  2,622 ppm tem-se valor igual a um, mas buscando este sinal no mapa de contornos HMQC percebe-se que o mesmo trata-se de um  $\text{CH}_2$ . Assim sendo foi possível determinar que o acoplamento percebido no mapa de contornos HMBC acontece com o H5''. Os hidrogênios metilênicos H5'' são distintos por terem como vizinhança um centro quiral, ou seja, estes hidrogênios são diastereotópicos. Determinando-se a posição do H5'', buscando-se o mapa de contornos HMQC, observa-se a diferença entre os hidrogênios citados e a posição do C5'' com deslocamento químico de  $\delta$  38,463 ppm.

Tendo-se a localização do hidrogênio H5'', pelo mapa de contornos COSY é possível então localizar o hidrogênio H4'' e em seguida o H3''. O deslocamento químico destes dois hidrogênios seria respectivamente de  $\delta$  4,053-4,140 ppm com integral igual a um e  $\delta$  1,536-1,868 ppm com integral igual a cinco, ou seja, há sobreposição do H3'' com outros hidrogênios.

O hidrogênio H4'' apresenta acoplamento com um hidrogênio que pelo mapa de contornos HMQC não apresenta correlação com nenhum carbono, ou seja, este acoplamento escalar observado acontece então entre o H4'' e a hidroxila ligada ao carbono C4''. O hidrogênio da hidroxila apresenta deslocamento químico na faixa de  $\delta$  5,135-5,185 ppm e C4''  $\delta$  61,219 ppm.

Através do mapa de contornos COSY tem-se que o acoplamento do hidrogênio H4'' com o H3'' gera duas correlações, pois H3'' trata-se de hidrogênios diastereotópicos. A partir destes dois sinais do H3'' define-se a localização do hidrogênio H2'', um multiplete com integral igual a um, na faixa que vai de  $\delta$  4,414-4,531 ppm. Com base neste sinal referente ao hidrogênio H2'', ainda no mesmo mapa de contornos COSY, determina-se a localização dos hidrogênios H12. O carbono C2'' foi localizado pelo mapa de contornos HMQC e confirmado pelo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  com deslocamento químico igual a  $\delta$  67,526 ppm.

A atribuição dos demais sinais de hidrogênios e de carbonos da molécula da sinvastatina foi reiniciada pelo C1 e H1 que teriam seus deslocamentos químicos elevados em função do efeito anisotrópico existente em uma ligação C-O. Este efeito anisotrópico só não é maior que o causado pelo sistema  $\pi$  existente entre os carbonos C4=C4a e C5=C6. Dessa forma o carbono C1 pode ser atribuído com deslocamento  $\delta$  de 75,759 ppm, o único nesta região até então não determinado. Pelo

mapa de contornos HMQC o hidrogênio H1 pode ser observado com deslocamento entre  $\delta$  4,414-4,531 ppm, um multiplete com integração igual a um.

No mapa de contornos COSY o hidrogênio H1 tem identificados acoplamentos escalares. Um deles é atribuído ao hidrogênio H8a na região de  $\delta$  2,247-2,447 ppm visto que no mapa de contornos HMQC este sinal só pode ser atribuído a um CH. O carbono C8a possui a partir disso deslocamento  $\delta$  igual a 36,578 ppm. Já as outras duas correlações associadas ao hidrogênio H1 em COSY referem-se aos hidrogênios H2 que são diastereotópicos. Um destes sinais corresponde ao hidrogênio com deslocamento de  $\delta$  1,909-2,034 ppm, com integração igual a um. A diferença entre os hidrogênios pode ser confirmada pelo mapa de contornos HMQC onde o C2 em  $\delta$  32,057 ppm tem acoplamento com dois sinais diferentes. O terceiro sinal do mapa de contornos COSY equivale ao segundo hidrogênio H2 com deslocamento entre  $\delta$  1,536-1,868 ppm sobreposto a outros quatro hidrogênios. Estes quatro hidrogênios já foram parcialmente atribuídos e nomeados como um dos H12, os dois hidrogênios H3", restando um único hidrogênio ainda não nomeado.

Buscando no mapa de contornos COSY acoplamentos do H2 são encontrados sinais sugestivos do acoplamento de H2a/H2b, H2b/H3 e H2a/H3. Este último é caracterizado por duas correlações características dos acoplamentos dos hidrogênios diastereotópicos H2 com o H3. Dessa forma H3 está localizado no espectro de ressonância de hidrogênio na região de  $\delta$  2,247-2,447 ppm, sobreposto aos hidrogênios H5" e H8a. A integração desta região indica por outro lado a existência de quatro hidrogênios restando um que ainda não foi atribuído.

Para os carbonos e hidrogênios da região que envolve as ligações duplas entre os carbonos, mais especificamente C4=C4a e C5=C6, espera-se em função do efeito anisotrópico maior desproteção, ou seja, mais alto deslocamento para os átomos envolvidos. Sendo assim em função da multiplicidade atribui-se ao hidrogênio H4 como um sinal largo em  $\delta$  5,499 ppm com valor de integração igual a um. Já o hidrogênio H5 seria o duplete em  $\delta$  5,963 ppm e o hidrogênio H6 o multiplete na região de  $\delta$  5,743-5,814 ppm. No mapa de contornos COSY acoplamentos escalares estão bem definidos entre H5/H6 e H4/H3. Com a definição dos hidrogênios vinílicos, avaliando o mapa de contornos HMQC atribui-se os deslocamentos dos carbonos C4, C5 e C6.

A localização do H7 foi baseada na correlação existente com o hidrogênio H6, permitindo identificar a região do deslocamento em  $\delta$  2,247-2,447 ppm sobreposto ao hidrogênios H3, H5" e H8a. Através do H7 localiza-se o H10 em  $\delta$  0,832 ppm. Considerando a correlação percebida no mapa de contornos COSY entre o H3 com hidrogênios metílicos, tem-se como determinar-se então o deslocamento do hidrogênio H9.

Nas Tabelas 3.20 (p.62), 3.18 (p.60) e 3.19 (p.61) estão apresentados os deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios da sinvastatina, bem como as correlações observadas no mapa de contornos COSY, os acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC (Tabela 3.19, p.61) e as constantes de acoplamentos possíveis de serem determinadas através do espectro de ressonância magnética de hidrogênio  $^1\text{H}$ .

Tabela 3.18. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a simvastatina com correlações observadas no mapa de contornos COSY

$^1\text{H}$	( $\delta$ ) (ppm)	Correlação COSY
1	4,414-4,531	H8a; H2a; H2b
2	a: 1,909-2,034	H3; H2b; H1
	b: 1,536-1,868	H3; H2a; H1
3	2,247-2,447	H4; H9; H2a; H2b
4	5,499	H3
5	5,963	H6
6	5,743-5,814	H5; H7
7	2,247-2,447	H6; H10
8	1,536-1,868	H11; H8a
8a	2,247-2,447	H8; H1
9	1,022	H3
10	0,832	H7
11	1,176-1,392	H8
12	a: 1,536-1,868	H2''
	b: 1,176-1,392	H2''
3'	1,406-1,539	H4'
4'	1,058	H3'
2''	4,414-4,531	H12a; H12b; H3''a; H3''b
3''	a e b: 1,536-1,868	H3''a; H3''b; H2''; H4''
4''	4,053-4,140	OH; H3''a; H3''b; H5''a; H5''b
5''	a: 2,622	H5''b; H4''
	b: 2,247-2,447	H5''a; H4''
OH	5,186-5,247	H4''

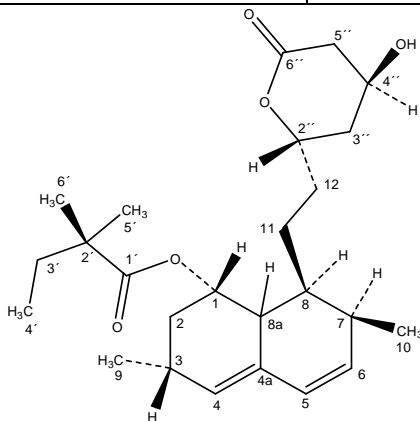


Tabela 3.19. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento ( $J$ ) em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a sinvastatina

$^1\text{H}$	( $\delta$ ) (ppm)	M, IN*	$J$ (Hz)
1	4,414-4,531	m, 1H	-
2	a: 1,909-2,034	m, 1H	-
	b: 1,536-1,868 (sobrep. 12a, 3'', 8)	m, 5H	-
3	2,247-2,447 (sobrep. 5'', 7, 8a)	m, 4H	-
4	5,499	sl, 1H	-
5	5,963	d, 1H	9,5
6	5,743-5,814	m, 1H	-
7	2,247-2,447 (sobrep. 3, 5'', 8a)	m, 4H	-
8	1,536-1,868 (sobrep. 2b, 12a, 3'')	m, 5H	-
8a	2,247-2,447 (sobrep. 3, 5'', 7)	m, 4H	-
9	1,022	d, 3H	7,3
10	0,832	d, 3H	6,8
11	1,176-1,392 (sobrep. 12b)	m, 3H	-
12	a: 1,536-1,868 (sobrep. 2b, 3''), 8)	m, 5H	-
	b: 1,176-1,392 (sobrep. 11)	m, 3H	-
3'	1,406-1,539	m, 2H	-
4'	0,769	t, 3H	7,3
5'	1,058	s, 6H	-
6'	1,058	s, 6H	-
2''	5,186-5,247	d, 1H	3,2
3''	a e b: 1,536-1,868 (sobrep. 2b, 12a, 8)	m, 5H	-
4''	4,053-4,140	m, 1H	-
5''	a: 2,622	dd, 1H	17,4; 4,5
	b: 2,247-2,447 (sobrep. 3, 7, 8a)	m, 4H	-
OH	5,135-5,185	m, 1H	-

\*Legenda: m = múltiplo, s = simples, d = duplo, t = triplo, dd = duplo duplo, sobrep. = sobreposto

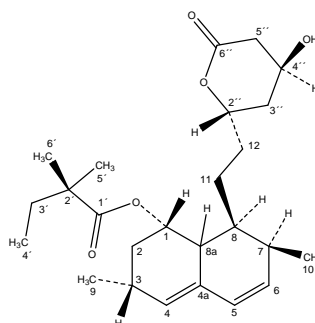
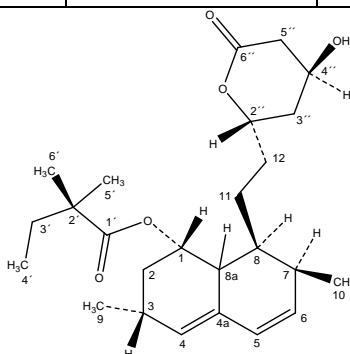


Tabela 3.20. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC para a simvastatina

$^{13}\text{C}$	Tipo de carbono	$\delta$ (ppm)	HMBC		
			$^2j_{\text{C-H}}$	$^3j_{\text{C-H}}$	$^nj_{\text{C-H}}$ ; n= 4, 5
1	CH	75,759	H2	H8	H11
2	CH <sub>2</sub>	32,057	-	H4; H9	-
3	CH	26,690	H2; H4; H9	-	-
4	CH	129,062	-	H2; H5; H9	-
4a	C	131,421	H5	H6	-
5	CH	128,167	H6	H4; H7	-
6	CH	132,842	H5; H7	H10	-
7	CH	30,080	H6; H10	H5; H11	-
8	CH	36,177	H7	H6; H10	-
8a	CH	36,578	-	H2; H4; H5	-
9	CH <sub>3</sub>	22,704	-	H2; H4	-
10	CH <sub>3</sub>	13,524	H7	H6	H5
11	CH <sub>2</sub>	23,608	-	-	-
12	CH <sub>2</sub>	32,440	H11	-	-
1'	C=O	176,506	-	H3'; H5'; H6'	-
2'	C	42,316	H3'; H5'; H6'	H4'	-
3'	CH <sub>2</sub>	32,409	H4'	H5'; H6'	-
4'	CH <sub>3</sub>	9,033	H3'	-	H5'; H6'
5' / 6'	CH <sub>3</sub>	24,340 e 24,380	-	H3'; H5'; H6'	-
2''	CH	67,526	H3''	-	-
3''	CH <sub>2</sub>	35,285	-	OH; H5; H5''	-
4''	CH	61,219	H3''; H5''	-	-
5''	CH <sub>2</sub>	38,463	-	OH	-
6''	C=O	170,060	H5''	-	-



### 3.1.3. Lovastatina

A lovastatina é um fármaco de fórmula mínima  $C_{24}H_{36}O_5$  com massa molar de  $404,54 \text{ g.mol}^{-1}$ , apresentando-se como um pó branco e inodoro. A lovastatina é considerada como sendo praticamente insolúvel em água, solúvel acetona, acetonitrila e clorofórmio. O ponto de fusão descrito para o fármaco é de  $174,5^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de nitrogênio (INDEX MERCK, 2000). A lovastatina (Figura 3.17) também é uma estatina empregada no tratamento de hiperlipidemias relacionada à inibição da atividade de enzima HMG-Coa redutase (FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII, 2002; THE UNITED STATES PHARMCOPOEIA: USP 31, 2008).

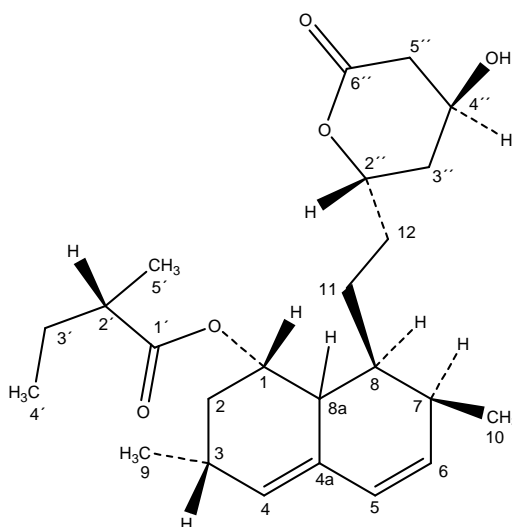


Figura 3.17. LVT ou [8 - [2 - (4 - hidroxi - 6 - oxo - oxan - 2 il) etil] - 3, 7- dimetil - 1, 2, 3, 7, 8, 8a - hexa hidronaftaleno - 1 - il] 2 - metilbutanoato (IUPAC) [número de registro: 75330-75-5]

#### 3.1.3.1. Solubilidade e LOG P

A solubilidade da lovastatina em água foi determinada em três diferentes temperaturas,  $25^\circ$ ,  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}$ . Para todos os casos preparou-se solução saturada do fármaco que foi filtrada em membrana de  $0,45\mu\text{m}$  antes da análise. O doseamento do fármaco foi conduzido em HPLC conforme metodologia da USP 31 (THE UNITED STATES PHARMCOPOEIA: USP 31, 2008). Os resultados de solubilidade estão apresentados na Tabela 3.21.

Tabela 3.21. Solubilidade da lovastatina em água nas temperaturas de  $25^\circ$ ,  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}^*$

Temperatura	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) ( $\pm$ CV)	Concentração ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) ( $\pm$ CV)
$25^\circ\text{C}$	$9,0 \times 10^{-4}$ ( $\pm 4,2\%$ )	$2,2 \times 10^{-6}$ ( $\pm 4,2\%$ )
$30^\circ\text{C}$	$8,8 \times 10^{-4}$ ( $\pm 3,9\%$ )	$2,2 \times 10^{-6}$ ( $\pm 3,9\%$ )
$37^\circ\text{C}$	$5,6 \times 10^{-4}$ ( $\pm 3,7\%$ )	$1,4 \times 10^{-6}$ ( $\pm 3,7\%$ )

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

A interpretação inicial dos dados de solubilidade para a lovastatina em água, nas diferentes temperaturas avaliadas, indica que há redução de solubilidade da mesma à medida que há elevação da temperatura. Os valores encontrados foram analisados pelo teste ANOVA (One Way – nonparametric test) indicando que não há diferença significativa entre os mesmos, sendo o valor de  $p > 0,1$ . A variação encontrada refere-se possivelmente à limitações da técnica analítica empregada ou mesmo à preparação de amostra.

A solubilidade da lovastatina em diferentes solventes, conforme dados bibliográficos, está apresentada na Tabela 3.22. Serajuddin (1991) encontrou que a solubilidade da lovastatina em tampão pH 5,0 é de  $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Conforme Brenner (1992) a lovastatina, em função de sua estrutura, não tem capacidade tamponante nem constante de dissociação ácido/base.

Tabela 3.22. Solubilidade da lovastatina em diversos solventes (BRENNER et al, 1992; INDEX MERCK, 2000; SUN et al., 2005)

Solvente	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (mol.L <sup>-1</sup> )
Clorofórmio	350	$8,65 \times 10^{-1}$
Etanol	16	$3,90 \times 10^{-2}$
n-octanol	2	$5,00 \times 10^{-3}$
Acetona	47	$1,16 \times 10^{-1}$
Acetonitrila	28	$6,90 \times 10^{-2}$
n-propanol	11	$2,70 \times 10^{-2}$
Água	$4,0 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-6}$

O estudo de coeficiente de partição óleo/água para a lovastatina considerou o quociente entre a concentração do fármaco em n-octanol e água. Não foram escolhidos o fluido intestinal e estomacal já que a lovastatina não sofre ionização e dissolução pH dependente.

O fármaco foi dissolvido em n-octanol na concentração de  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e posteriormente misturado à água. Após período de equilíbrio a lovastatina foi dosada nas duas fases. O LOG P da lovastatina encontrado foi de  $4,1 \pm 0,1$ . Brenner (1992) cita que o LOG P da lovastatina foi calculado como sendo igual a 4,08 e Moffat (2003) a 4,26. O valor encontrado no estudo prático é compatível com o descrito na bibliografia.

Um valor de LOG P igual a 4,1 indica que a substância em questão é mais lipofílica apresentando reduzida afinidade pela água. Parte dos problemas de biodisponibilidade da lovastatina poderia ser justificada por isso, já que a mesma está incluída na Classe Biofarmacêutica II, caracterizada por ter biodisponibilidade limitada à dissolução. Por outro lado este valor de LOG P igual a 4,1 indica que a permeabilidade do fármaco seria facilitada no TGI, pois o fármaco teria afinidade por membranas celulares o que está relacionado ao processo de permeação e absorção.

### 3.1.3.2. Ponto de fusão

O ponto de fusão da lovastatina utilizada na preparação de formulações com  $\beta$ -ciclodextrina foi de 171,3°C, enquanto que dados da literatura indicam ponto de fusão de 174,5°C (INDEX MERCK, 2000). Esta análise permitiu a identificação da lovastatina.

### 3.1.3.3. Análise elementar

A Tabela 3.23 mostra os teores de carbono e hidrogênio para a lovastatina conforme apresentado por Breener (1992) e no Index Merck (2000). Os valores obtidos com o estudo prático estão de acordo com os dados teóricos, garantindo a identificação da matéria-prima.

Tabela 3.23. Resultados de CHN para a lovastatina\*

C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	Porcentagem calculada		Porcentagem experimental $\pm$ CV	
	C	71,26%	C	71,39% ( $\pm$ 0,04%)
H	8,97%	H	9,09% ( $\pm$ 0,70%)	
O	19,77%	O	ND	

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

### 3.1.3.4. Desvio da luz polarizada

O desvio da luz polarizada foi avaliado para a solução de lovastatina em acetonitrila a 25°C e na concentração de 0,5% (p/v) foi de + 324°  $\pm$  0,1%. De acordo com Brenner (1992) e o Index Merck (2000) o poder rotatório  $[\alpha]_D$  da lovastatina em acetonitrila é a 25°C igual a + 330° e + 323°, respectivamente. Baseando-se nos resultados a matéria-prima foi identificada como sendo lovastatina.

### 3.1.3.5. Granulometria

A granulometria da lovastatina foi determinada por espalhamento de luz e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3.24 (p.66). O valor de d10 foi de 1,707  $\mu$ m, ou seja, 10% das partículas são menores que 1,707  $\mu$ m e 90% maiores que este valor. O mesmo é válido para o valor d90 de 45,250  $\mu$ m, onde 90% das partículas são menores que 45,250  $\mu$ m e 10% maior que este valor. O elevado valor de d90 pode ser justificado não somente pela presença de partículas maiores, mas também por se tratar de um pó hidrofóbico em que houve aglomeração de partículas gerando um resultado numericamente maior e com coeficiente de variação (CV) também maior.



O valor de d50 igual a 8,242 µm indica que este é o tamanho médio das partículas e indica também o valor onde a curva de Gauss pode ser dividida em partes iguais. A Figura 3.18 representa o perfil de distribuição das partículas.

Tabela 3.24. Valores de d10, d50 e d90 para a análise granulométrica da lovastatina\*

d10 (± CV)	d50 (± CV)	d90 (± CV)
1,707 µm (± 0,2%)	8,242 µm (± 0,4%)	45,250 µm (± 9,4%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 3. CV indica o coeficiente de variação em porcentagem

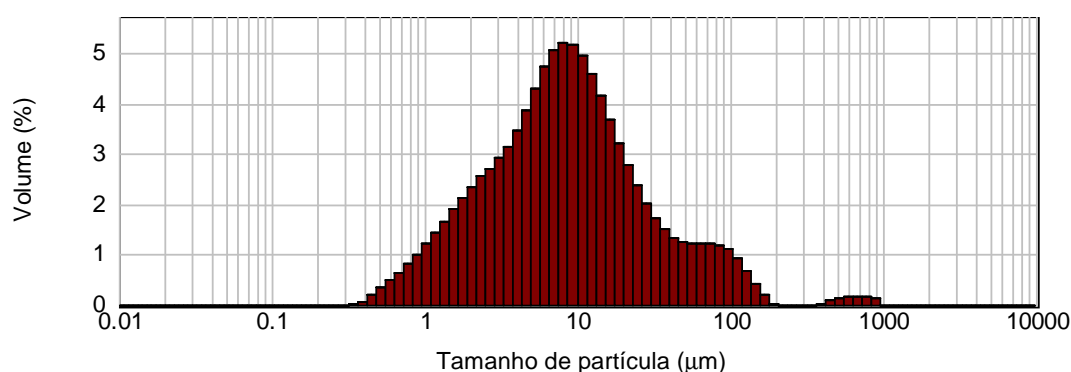


Figura 3.18. Histograma da distribuição das partículas da matéria-prima lovastatina.

A análise do perfil de distribuição de partículas da lovastatina indica que estão presentes na amostra partículas com diâmetro chegando até a 1000 µm. Esta interpretação não procede, pois como se trata de um pó muito hidrofóbico e com diâmetro reduzido há forte tendência de coesão das partículas gerando agregados que são analisados e considerados como uma partícula única. Mesmo adicionando-se lauril sulfato de sódio como molhante a agregação das partículas não foi eliminada, apenas minimizada. A análise em si de tamanho de partícula baseia-se na formação de uma dispersão do pó em um meio líquido e neste sistema disperso observou-se apenas reorganização do mesmo na tentativa de redução da tensão interfacial. De qualquer forma, percebe-se que se trata de uma partícula pequena, micronizada, compatível com os pré-requisitos de um fármaco pertencente à Classe II da BCS.

### 3.1.3.6. Absortividade molar

A absortividade molar da lovastatina ( $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) na região do ultravioleta, em nm, está apresentada na Figura 3.19 (p.67). Foram selecionadas a água, o metanol, o ácido clorídrico 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  e o hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ . Embora o metanol não seja um solvente farmacêutico foi selecionado por proporcionar fácil solubilização da lovastatina.

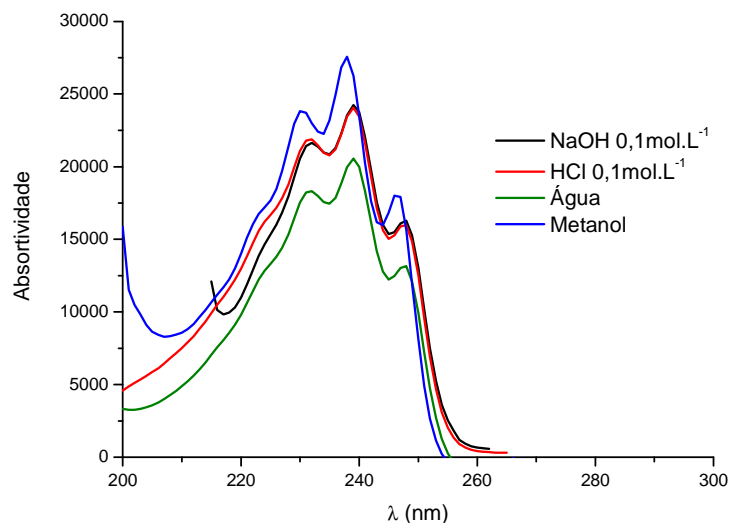


Figura 3.19. Perfil de absorvidade molar da lovastatina na região de 200 nm a 300 nm em diferentes solventes (O número de amostras foi igual a 3 para cada solvente).

Na Tabela 3.25 estão apresentadas as absorvidades específicas para alguns comprimentos de onda na região do ultravioleta (UV). Estes comprimentos de onda foram escolhidos após aplicação da primeira derivada sobre o espectro UV. O perfil encontrado, os comprimentos de absorção máxima na região do ultravioleta e absorvidade molar são compatíveis com o descrito por Brenner e colaboradores (1992) e Moffat e colaboradores (2003).

Tabela 3.25. Absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da lovastatina em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta\*

	228 nm	236 nm	245 nm
Água	17331 ( $\pm$ 3,5%)	19664 ( $\pm$ 3,2%)	13314 ( $\pm$ 3,6%)
Metanol	19001 ( $\pm$ 1,1%)	22216 ( $\pm$ 1,2%)	14912 ( $\pm$ 1,0%)
HCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	19521 ( $\pm$ 2,7%)	21723 ( $\pm$ 2,0%)	14947 ( $\pm$ 2,9%)
NaOH 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	20215 ( $\pm$ 2,9%)	23192 ( $\pm$ 3,3%)	16818 ( $\pm$ 3,7%)

\*Estudo onde o número de amostras foi igual a 12.

### 3.1.3.7. Espectroscopia da Absorção na Região do Infravermelho

A Figura 3.20 apresenta o espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a lovastatina e na Tabela 3.26 (p.69) a atribuição das principais bandas encontradas (BRENNER et al, 1992; MOFFAT et al.; 2003).

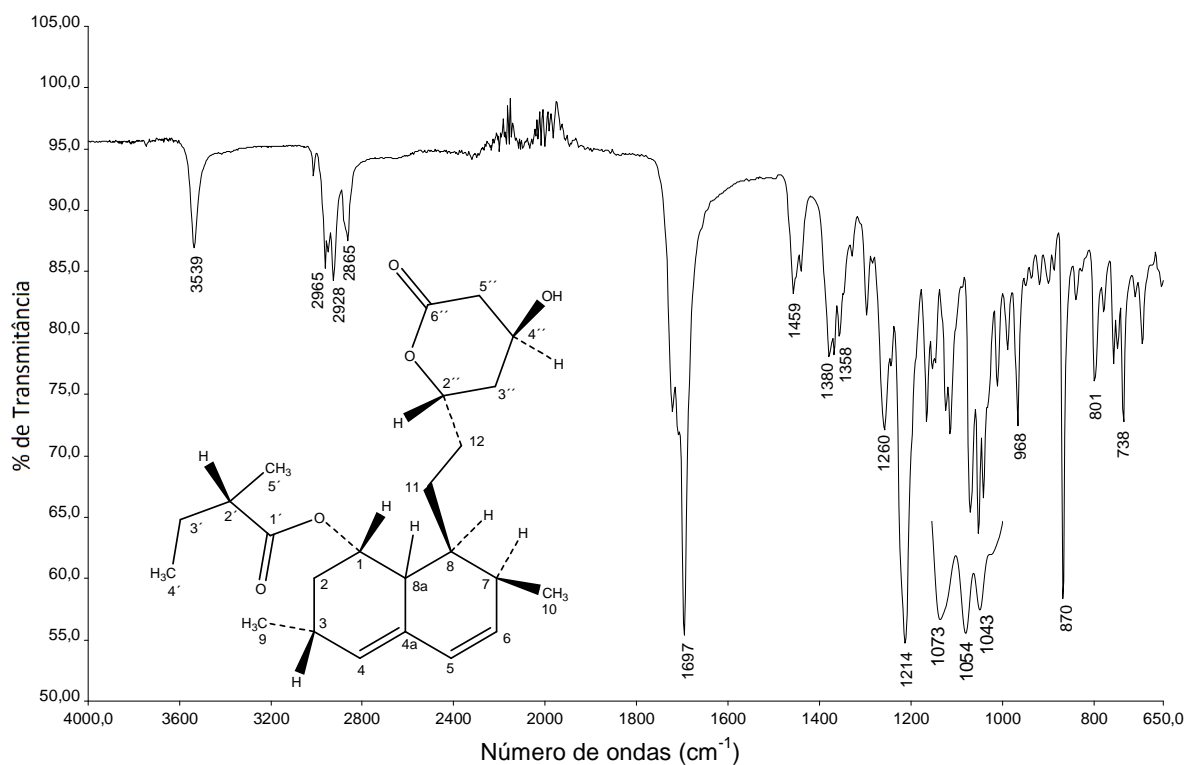


Figura 3.20. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho para a lovastatina.

Tabela 3.26. Atribuição das principais bandas presentes no espectro de absorção do Infravermelho para a lovastatina

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições*
3539	Estiramento O-H de álcool Ligação de hidrogênio intermolecular**
2965	Estiramento assimétrico C-H de CH <sub>3</sub>
2928	Estiramento assimétrico C-H de CH <sub>2</sub>
2865	Estiramento simétrico C-H de CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>
1697	Estiramento C=O de éster (C1´) Estiramento C=O de éster (lactona - C6´´)
1459	Deformação assimétrica de CH <sub>3</sub> tipo balanço Estiramento C=C
1380, 1358	Deformação CH <sub>3</sub> tipo guarda-chuva
1260	Deformação assimétrica C-O-C de lactona
1214	Deformação assimétrica C-O-C de éster
1073	Estiramento simétrico C-O-C de lactona
1054	Estiramento simétrico C-O-C de éster
1043	Estiramento C-OH de álcool secundário
870	Deformação C-H de alceno trissubstituído R <sub>1</sub> CH=CHR <sub>2</sub>
801 e 738	C-H fora do plano R <sub>2</sub> C=CHR

\* SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. 1997

\*\* CEJKA et al., 2003

### 3.1.3.8. Análise térmica

A curva TG do lovastatina (Figura 3.21, p.70) apresenta basicamente um único evento de perda de massa. De acordo com os resultados observados o fármaco apresenta estabilidade térmica até temperaturas próximas a 220°C sem perda significativa de massa. Após esta temperatura inicia-se a primeira decomposição com perda de 95,4% de massa e velocidade máxima de decomposição em 297°C. Terminada a análise todo o material foi decomposto não gerando resíduo sólido.

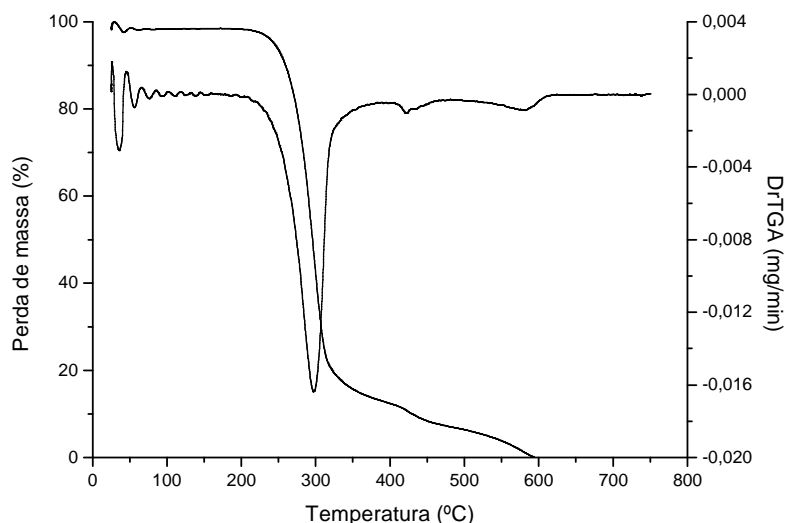


Figura 3.21. Curva TG e DTG para a lovastatina obtida sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A curva DSC da lovastatina é apresentada na Figura 3.22. A partir do perfil encontrado observa-se o pico endotérmico de fusão da lovastatina em  $171,2^\circ\text{C}$  com  $T_0$  (temperatura onset) igual a  $170^\circ\text{C}$ . Seguido ao pico de fusão, em temperaturas superiores a  $220^\circ\text{C}$ , conforme comprovado pela análise TG, há perda significativa de massa da lovastatina. Os dados obtidos estão de acordo com a literatura que destaca  $T_0$  em  $171^\circ\text{C}$  e fusão em  $172^\circ\text{C}$  (BRENNER et al., 1992; SOUZA et al., 2007). Seguido ao pico de fusão, em temperaturas superiores a  $285^\circ\text{C}$ , conforme comprovado pela análise TG, há perda significativa de massa do fármaco (Fig. 3.22).

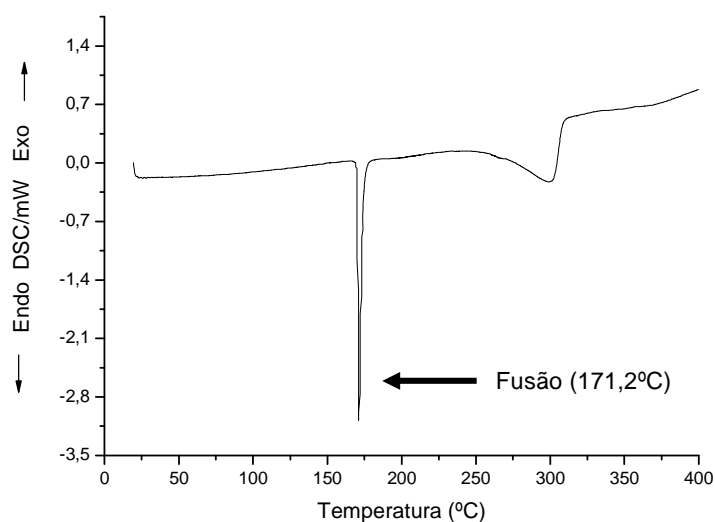


Figura 3.22. Perfil da curva DSC para a lovastatina obtida sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 3.1.3.9. Difratomia de raios-X de pó

O difratograma de raios-X de pó para a lovastatina está representado na Figura 3.23 e a Tabela 3.27 mostra os ângulos de difração ( $2\theta$ ), a intensidade relativa dos picos ( $I/I_0$ ) e as distâncias interplanares ( $d$ ), obtidas a partir da Lei de Bragg, onde  $nK\alpha=2d\text{Sen}\theta$ , na qual  $K\alpha=1,5405$ .

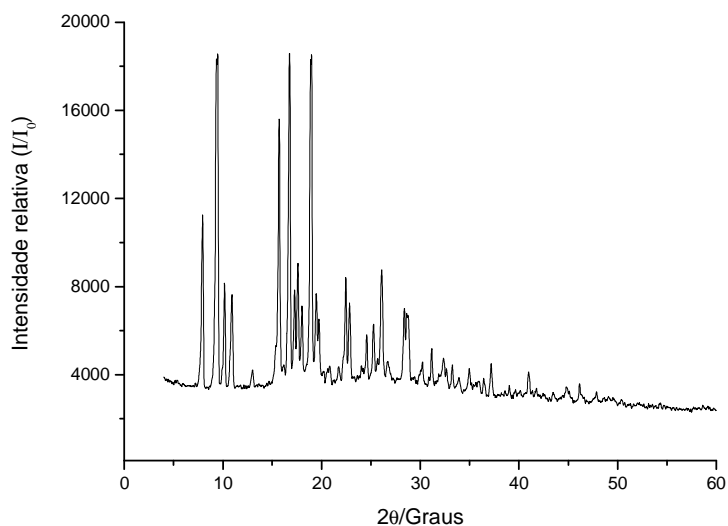


Figura 3.23. Difrátograma de raios-X de pó da lovastatina.

O perfil de difração de raios-X para a lovastatina pode ser considerado idêntico ao descrito por Brenner e colaboradores (1992) que destacou também a inexistência de polimorfos para a lovastatina.

Tabela 3.27. Medidas dos ângulos de difração ( $2\theta$ ), intensidade relativa ( $I/I_0$ ) e distâncias interplanares ( $d$ ) da lovastatina

$2\theta$ (Graus)	$I/I_0$ (%)	$d$ (Å)
9,5	99,7	10,4
10,2	43,8	9,7
10,9	41,0	9,0
15,7	84,0	6,3
16,8	100,0	5,9
17,3	42,2	5,7
17,6	48,7	5,6
19,0	99,7	5,2
22,5	45,2	4,4
26,1	47,2	3,8

Toda a caracterização realizada por difração de raios-X, juntamente com a espectroscopia na região do infravermelho e análise térmica permitiram, dentre outras coisas, caracterizar a lovastatina como um fármaco que se encontrava na forma cristalina. Esta cristalinidade foi primeiramente identificada pela presença do pico em  $3539\text{ cm}^{-1}$  no espectro de infravermelho. Este sinal foi descrito por Cejka e colaboradores (2003) como característico da cristalinidade da lovastatina. Este sinal agudo está relacionado à ligação de hidrogênio intermolecular entre a hidroxila alcoólica da lactona de uma molécula à carbonila C1' de outra molécula. Já nos estudos de difração de raios-X foi nítido que a lovastatina encontrava-se na forma cristalina. Por esta técnica, um feixe incidente e definido difratou através da lovastatina e a medida do ângulo de difração do raio emergente permitiu elucidar a distância dos átomos no cristal. Quanto mais organizado do ponto de vista molecular for o pó observam-se picos agudos e intensos. Foi em função da intensidade dos picos numa região específica que a lovastatina foi caracterizada como cristalina.

#### 3.1.3.10. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear foi empregada para caracterização da lovastatina utilizando as técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ , mapa de contornos COSY, HMQC e HMBC, subespectro DEPT 135 e RMN de  $^{13}\text{C}$ . A atribuição dos sinais de ressonância de hidrogênio observados no espectro da lovastatina teve como ponto de partida a localização e atribuição dos hidrogênios H4, H5 e H6 respectivamente em  $\delta$  5,499 ppm,  $\delta$  5,954 ppm e  $\delta$  5,729-5,823 ppm. A determinação exata de cada posição foi iniciada pela caracterização do duplete referente ao H5. Após sua localização baseando-se em uma seção do mapa de contornos COSY foi possível decidir sobre o acoplamento escalar e deslocamento do H6, para logo em seguida atribuir o H4. Em todas as situações a integração dos sinais gerou valor igual a um, corroborando a localização destes três hidrogênios vinílicos. Teoricamente os hidrogênios H4, H5 e H6 originam sinais que devem ser mais desprotegidos em função do sistema conjugado quando comparados aos outros hidrogênios, por exemplo, hidrogênios metílicos da lovastatina. Pelo mapa de contornos HMQC os hidrogênios H4, H5 e H6 podem ser associados a carbonos (C4, C5 e C6) que só apresentam um hidrogênio ligado confirmando mais uma vez a atribuição realizada. Pelo mapa de contornos bidimensional HMBC percebe-se que o C4 tem acoplamento de longa distância com o H5 e um outro sinal na região de  $\delta$  0,960-1,063 ppm. Este outro sinal trata-se do hidrogênio metílico H9. O carbono C6 encontra-se em situação semelhante, pois também apresenta acoplamento de longa distância com o H5 e com hidrogênio metílico na região de  $\delta$  0,755-0,893 ppm referente ao H10. Ainda pode-se notar que o H5 tem acoplamento de longa distância com um carbono em  $\delta$  131,530 ppm, que não aparece no mapa de contornos HMQC, tratando-se dessa forma do C4a. O carbono C4a foi confirmado pelo mapa de contornos HMBC já que apresenta acoplamento com os hidrogênios H5 e H6.

Partindo-se do sinal do H6 chega-se a um acoplamento escalar com um hidrogênio na região de  $\delta$  2,238-2,452 ppm. Observando-se pelo mapa de contornos HMQC deduz-se se tratar de um único hidrogênio ligado ao carbono, mais especificamente do H7. Este sinal do hidrogênio H7 está sobreposto a outros sinais sendo que nesta região a integração indicou a presença de cinco hidrogênios.

No mapa de contornos HMQC há um sinal de hidrogênio na região de  $\delta$  5,147-5,201 ppm que não está associado a nenhum carbono, mas que apresenta acoplamento escalar com sinal na faixa de  $\delta$  4,045-4,137 ppm. Este sinal na integração do espectro de hidrogênio gera resultado igual a um e o hidrogênio com o qual apresenta acoplamento escalar também tem um como valor de integral. Observando a molécula da lovastatina pode-se atribuir então este sinal à hidroxila ligada ao carbono C4". No mapa de contornos COSY o hidrogênio desta hidroxila tem acoplamento escalar com o H4" em  $\delta$  4,045-4,137 ppm. O carbono C4" pode receber então atribuição de  $\delta$  61,287 ppm.

Partindo-se do hidrogênio H4" atribui-se pelo mapa de contornos COSY os hidrogênios H3" e H5" que mostram-se como sinais duplicados por se tratarem de hidrogênios diastereotópicos. Ainda no mapa de contornos COSY confirma-se a localização de H5" já que o mesmo só pode fazer acoplamento escalar com o H4" e o H3". H3" pode, além do H4" e H5", acoplar-se com o H2". No espectro de hidrogênio um dos sinais para o H5",  $\delta$  2,621 ppm, foi integrado com sendo igual a um e pelo mapa de contornos HMQC é nítido que o C5" em  $\delta$  38,503 ppm está associado a dois sinais distintos. O outro hidrogênio H5" está sobreposto a demais hidrogênios na região de  $\delta$  2,238-2,452 ppm. Assim sendo, H5" pode ser classificado como diastereotópico. A sobreposição também acontece para o H3" na região de  $\delta$  1,472-1,875 ppm.

No mapa de contornos COSY o H2" foi atribuído em função do acoplamento com o H3", sendo seu deslocamento encontrado na região de  $\delta$  4,416-4,507 ppm. O carbono C2" foi então localizado no mapa de contornos HMQC com deslocamento  $\delta$  75,777 ppm. A partir do hidrogênio H2", pelo mapa de contornos COSY, atribui-se o hidrogênio H12, com sinal duplicado, indicando a presença de hidrogênios diastereotópicos, na região de  $\delta$  1,185-1,469 e 1,472-1,875 ppm. O carbono C12, pelo mapa de contornos HMQC, foi localizado em  $\delta$  32,429 ppm.

Os hidrogênios metílicos H4' foram localizados na região de  $\delta$  0,755-0,893 ppm, sendo que a partir deste sinal foi possível localizar os hidrogênios H3' e H2' no mapa de contornos COSY. Os respectivos carbonos foram localizados no mapa de contornos HMQC e confirmados no mapa de contornos HMBC. Todos os resultados de acoplamento de longa distância localizados foram compatíveis com a atribuição proposta.

Já os hidrogênios H8 e H8a tiveram sua atribuição determinada pelo mapa de contornos COSY já que espera-se acoplamento escalar dos hidrogênios H8a e H11 e dos hidrogênios H8 e H1. A confirmação da atribuição veio pelos acoplamentos de longa distância localizados no mapa de contornos HMBC. Determinou-se assim o deslocamento de H8 em  $\delta$  1,472-1,875 ppm e H8a em  $\delta$  2,238-2,452 ppm.



Com a análise dos mapas de contornos HMQC (<sup>1</sup>J), subespectro DEPT 135, espectro de RMN de <sup>1</sup>H, mapa de contornos COSY (Tabela 3.28), mapa de contornos HMBC e RMN de <sup>13</sup>C permitiu-se a partir dos dados de acoplamento escalar e de longa distância atribuir todos os sinais da molécula da lovastatina apresentados nas Tabelas 3.29 (p.75) e 3.30 (p.76).

Tabela 3.28: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) em DMSO-*d*<sub>6</sub> (400 MHz) para a lovastatina com correlações observadas no mapa de contornos COSY

<sup>1</sup> H	( $\delta$ ) (ppm)	Correlação COSY
1	5,229	H8a; H2a; H2b
2	a: 1,874-2,000	H3; H2b; H1
	b: 1,472-1,875	H3; H2a; H1
3	2,238-2,452	H4; H9; H2a; H2b
4	5,499	H3
5	5,954	H6
6	5,729-5,823	H5; H7
7	2,238-2,452	H6; H10
8	1,472-1,875	H11; H8a
8a	2,238-2,452	H8; H1
9	0,960-1,063	H3
10	0,755-0,893	H7
11	1,185-1,469	H8
12	a: 1,472-1,875	H2''
	b: 1,185-1,469	H2''
2'	2,238-2,452	H5'
3'	a: 1,472-1,875	H4'; H3'b
	b: 1,185-1,469	H4'; H3'a
4'	0,755-0,893	H3'
5'	0,960-1,063	H2'
2''	4,416-4,507	H12a; H12b; H3''a; H3''b
3''	a: 1,472-1,875	H3''b; H2''; H4''
	b: 1,472-1,875	H3''a; H2''; H4''
4''	4,045-4,137	OH; H3''a; H3''b; H5''a; H5''b
5''	a: 2,621	H5''b; H4''
	b: 2,238-2,452	H5''a; H4''
OH	5,147-5,201	H4''

Tabela 3.29. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$ , multiplicidade (M), valor da integração do sinal (IN) no espectro de hidrogênio e constante de acoplamento ( $J$ ) em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a lovastatina

$^1\text{H}$	( $\delta$ ) (ppm)	M, IN*	$J$ (Hz)
1	5,229	s, 1H	-
2	a: 1,874-2,000	m, 1H	-
	b: 1,472-1,875 (sobrep. 12a, 3'', 8, 3'a)	m, 6H	-
3	2,238-2,452 (sobrep. 5'', 7, 8a, 2')	m, 5H	-
4	5,499	s, 1H	-
5	5,954	d, 1H	9,6
6	5,729-5,823	m, 1H	-
7	2,238-2,452 (sobrep. 5'', 3, 8a, 2')	m, 5H	-
8	1,472-1,875 (sobrep. 3'a, 2b, 12a, 3'')	m, 6H	-
8a	2,238-2,452 (sobrep. 5'', 3, 7, 2')	m, 5H	-
9	0,960-1,063	m, 6H	-
10	0,755-0,893	m, 6H	-
11	1,185-1,469 (sobrep. 3'b, 12b)	m, 4H	-
12	a: 1,472-1,875 (sobrep. 2b, 3'', 8, 3'a)	m, 6H	-
	b: 1,185-1,469 (sobrep. 11, 3'b)	m, 4H	-
2'	2,238-2,452 (sobrep. 5'', 3, 8a, 7)	m, 5H	-
3'	a: 1,472-1,875 (sobrep. 8, 2b, 12a, 3'')	m, 6H	-
	b: 1,185-1,469 (sobrep. 11, 12b)	m, 4H	-
4'	0,755-0,893	m, 6H	-
5'	0,960-1,063	m, 6H	-
2''	4,416-4,507	m, 1H	-
3''	a e b: 1,472-1,875 (sobrep. 3'a, 2b, 12a, 8)	m, 6H	-
4''	4,045-4,137	m, 1H	-
5''	a: 2,621	dd, 1H	3,5; 3,7
	b: 2,238-2,452 (sobrep. 3, 7, 8a, 2')	m, 5H	-
OH	5,147-5,201	m, 1H	-

\* Legenda: m = multipeto, s = simpleto, d = dupeto, t = tripleto, dd = duplo dupeto, sobrep. = sobreposto

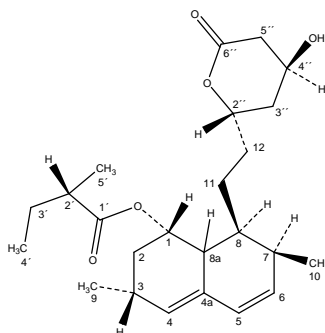
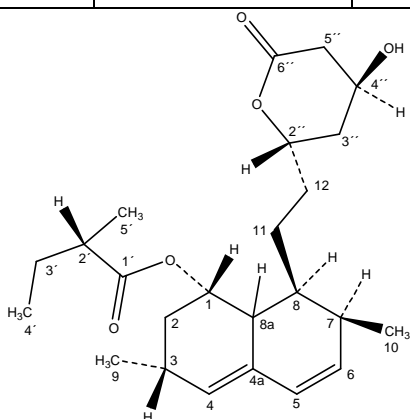


Tabela 3.30. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a lovastatina e acoplamentos de longa distância determinados pelo mapa de contornos HMBC

$^{13}\text{C}$	Tipo de carbono	$\delta$ (ppm)	HMBC		
			$^2j_{\text{C-H}}$	$^3j_{\text{C-H}}$	$^n j_{\text{C-H}}$ ; n= 4, 5
1	CH	67,425	H2	-	-
2	$\text{CH}_2$	31,959	-	H9; H4	-
3	CH	26,940	H9; H2; H4	-	-
4	CH	129,135	-	H2; H9; H5	-
4a	C	131,530	H5	H6	-
5	CH	128,239	H6	H8a; H4	-
6	CH	132,979	H7; H5	H10	-
7	CH	30,174	H10; H6	H5	-
8	CH	36,073	H7; H8a; H11	H10; H12; H6	-
8a	CH	36,451	H8	H7; H2; H5; H4	H3; H10
9	$\text{CH}_3$	22,559	-	H2	-
10	$\text{CH}_3$	13,598	-	H6	H8a; H5
11	$\text{CH}_2$	23,616	-	H8a	-
12	$\text{CH}_2$	32,429	-	-	-
1'	C=O	175,529	H2'	H3'; H5'	-
2'	CH	40,746	H3'; H5'	H4'	-
3'	$\text{CH}_2$	26,319	H2'	H5'	-
4'	$\text{CH}_3$	11,333	H3'	H2'	-
5'	$\text{CH}_3$	16,011	H2'	H3'	H4'
2''	CH	75,777	H12	-	-
3''	$\text{CH}_2$	35,356		H5''; OH	-
4''	CH	61,287	H5''; OH		-
5''	$\text{CH}_2$	38,503	-	OH	-
6''	C=O	170,179	H5''	-	-





## 4. Caracterização dos complexos

### 4.1. Valsartan

#### 4.1.1. Solubilidade Termodinâmica

A solubilidade de um fármaco pode ser considerada como critério de pureza baseando-se no conceito de que em um determinado solvente, a uma determinada temperatura e composição, a quantidade solúvel é constante e a mesma pode ser facilmente mensurada. Este valor nominal de solubilidade só chegaria a ser alterado quando houvesse algum tipo de perturbação no meio, interferindo na temperatura ou composição do sistema (GIBSON, 2001).

O estudo da mudança de solubilidade de um fármaco na presença de outra substância é a base da técnica conhecida como “solubilidade termodinâmica”, uma ferramenta simples do ponto de vista teórico e experimental, capaz de avaliar a alteração de solubilidade do valsartan em função da concentração de  $\beta$ -ciclodextrina. Seria observada então neste sistema a possível formação do complexo fármaco: $\beta$ -ciclodextrina.

Com a formação do complexo é possível determinar as constantes de equilíbrio ( $K_c$ ) e dissociação ( $K_d$ ). Uma grande variedade de métodos experimentais tem sido empregada na determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos, envolvidos no processo de formação dos compostos de inclusão, entre eles calorimetria, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta eficiência, experimentos de cinética e solubilidade, dentre outras (ROSS & REKHARSKY, 1996; MOSHER & THOMPSON, 2007).

Um dos métodos mais difundidos para determinação de constantes relacionadas à formação dos complexos foi descrito por Higuchi & Connors em 1965. Nesta metodologia é avaliada a interferência de um solubilizante sobre a concentração de um substrato, sendo frequentemente empregado como solubilizante a ciclodextrina de interesse (MARTIN DEL VALLE, 2004). A partir dos resultados de solubilidade do fármaco em função da crescente concentração de ciclodextrina pode-se construir um diagrama que apresentará um dos perfis propostos por Higuchi & Connors (1965). Este diagrama é caracterizado por possuir duas categorias denominadas como “A” e “B”. Os perfis do tipo “A” estão relacionados à formação de complexos solúveis enquanto que os perfis do tipo “B” estão associados à formação de complexos com baixa solubilidade em água. Dentre os perfis do tipo “B” estão os tipos  $B_1$  e  $B_s$ , sendo o primeiro característico para complexos insolúveis e o segundo característico para complexos parcialmente solúveis. Já os perfis do tipo “A” podem ser divididos em  $A_L$  onde há correlação constante entre a elevação da concentração de ciclodextrina e solubilidade da molécula hóspede,  $A_N$  característico de sistemas onde há elevação da solubilidade do complexo, mas com desvio negativo da isoterma gerada, e por fim  $A_P$  com a mesma característica de  $A_N$ , mas com desvio positivo da isoterma. (Figura 4.1, p.79).

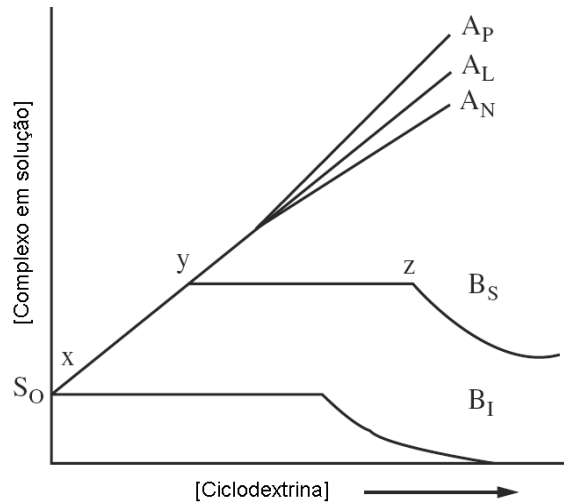


Figura 4.1. Diagrama de relação de solubilidade de fase de complexos formados entre ciclodextrina e molécula hóspede (adaptado de MOSHER & THOMPSON, 2007).

Os estudos para determinação da solubilidade da molécula hóspede em função da concentração de ciclodextrina permitem calcular a constante de equilíbrio para a formação do complexo. A constante ( $K_c$ ) de formação é determinada através de:

$$K_{1:1} = \frac{a}{S_0(1-a)}$$

Eq.1

Onde “a” é a inclinação da reta obtida pela concentração de fármaco em função da crescente adição de ciclodextrina.

Os parâmetros termodinâmicos como alteração na energia livre ( $\Delta G$ ), mudança na entalpia ( $\Delta H$ ) e variação de entropia ( $\Delta S$ ) podem ser estimados a partir da constante de equilíbrio para o complexo preparado entre a molécula hóspede e a ciclodextrina, sendo:

$$\Delta G = -RT \ln k_{1:1}$$

Eq. 2

Já a entalpia do sistema é calculada para a constante  $K_c$ , na proporção molar de 1:1, em várias temperaturas baseando-se na Equação de van't Hoff. Havendo disponíveis pelo menos duas constantes  $K_c$  calculadas, para duas diferentes temperaturas (em kelvin), tem-se que:

$$\text{Log} \left( \frac{K_2}{K_1} \right) = \frac{-\Delta H}{2,303R} \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1}$$

Eq. 3

Já a entropia ( $\Delta S$ ) da complexação pode ser avaliada pela expressão:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Eq. 4

O primeiro fármaco estudado foi o valsartan e através dos diagramas observados verifica-se inicialmente que com a elevação da temperatura há elevação da solubilidade do fármaco em água. O pH da solução foi medido no final do experimento variando entre 3,2 a 3,5, sugerindo assim a maior percentagem da forma não ionizada do valsartan que é menos solúvel em água. O ganho de solubilidade do valsartan na presença da concentração máxima de  $\beta$ -ciclodextrina ( $0,0158 \text{ mol. L}^{-1}$ ) no meio foi calculado para as temperaturas de  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ , sendo respectivamente, igual a 3,4, 3,0 e 2,7 vezes maior quando comparada à solubilidade em água do fármaco naquela temperatura. Pode-se verificar que o ganho de solubilidade é menor à medida que há elevação de temperatura, sugerindo que a complexação com a ciclodextrina se dá em menor extensão. Isso pode ser relacionado à natureza exotérmica de formação do complexo, ou seja, há menor estabelecimento de interações entre as subunidades fármaco e  $\beta$ -CD. O calor por si só aumenta a entropia vibracional causando também ruptura das ligações não covalentes que estabilizam a formação do complexo (FONSECA et al., 2006). A Figura 4.2 representa os diagramas de solubilidade do valsartan em função da concentração crescente de  $\beta$ -ciclodextrina.

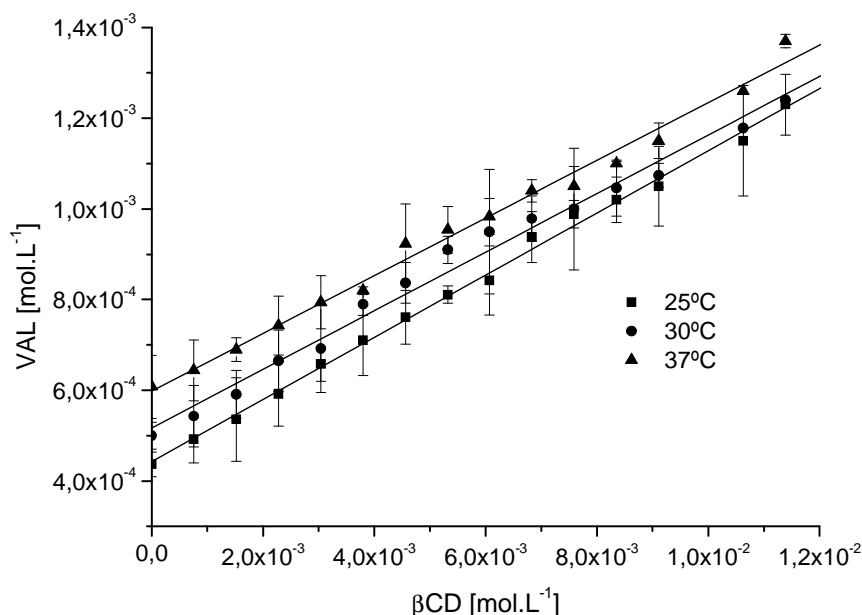


Figura 4.2. Diagrama de solubilidade do valsartan em presença de  $\beta$ -ciclodextrina nas temperaturas de  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ . (O número de amostras foi igual a 3).

A interpretação dos diagramas de solubilidade permitiu observar que o perfil encontrado segue o modelo tipo  $A_L$  descrito por Higuchi & Connors (1965) onde a adição de  $\beta$ -ciclodextrina possibilitou elevação da solubilidade do fármaco e formação de um complexo mais solúvel. Com base nestes perfis pode-se então calcular vários parâmetros termodinâmicos baseando-se nas equações de primeiro grau determinadas. A partir da Equação 1 calculou-se as constantes de formação para o complexo gerado e os valores foram de  $165,4 \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ,  $145,0 \text{ M}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$  e de  $111,3 \text{ M}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Observando-se os diferentes valores de  $K_c$  para a formação dos complexos, verifica-se que as mesmas têm significativo decaimento quando há elevação da temperatura. Esta redução é compatível e esperada nos processos exotérmicos (UEKAMA, 1998; BREWSTER & LOFTSSON, 2007). Relação semelhante entre constante de equilíbrio e temperatura foi descrita por Xavier (2004) e Karathanos (2007). Estudos conduzidos por Capello (2006) com o valsartan indicaram que a complexação com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina tem constante de formação da ordem de  $296 \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

As equações de primeiro grau e as constantes de formação calculadas para o VAL e  $\beta$ -CD estão relacionadas na Tabela 4.1. Os valores das constantes de formação encontradas sugerem uma fraca interação entre o fármaco e a  $\beta$ -CD (Tabela 4.1). A partir desta reduzida interação, considerando o efeito de diluição ocorrido após uma possível administração oral, teríamos rápida liberação do fármaco a partir do complexo. Segundo Thompson (1997) seria possível extrapolar e dizer que apenas cerca de 10% do valsartan permaneceria complexado à  $\beta$ -CD nestas condições (Figura 4.3, p.82).

Tabela 4.1. Parâmetros para a regressão linear do diagrama de solubilidade do valsartan em presença de  $\beta$ -CD\*.

Temperatura	Equação linear	R	Constante de formação ( $K_c$ )
$25^\circ\text{C}$	$y = 0,0685x + 0,0004$	0,9960	$165,4 \text{ M}^{-1} \pm 0,16$
$30^\circ\text{C}$	$y = 0,0646x + 0,0005$	0,9947	$145,0 \text{ M}^{-1} \pm 0,08$
$37^\circ\text{C}$	$y = 0,0636x + 0,0006$	0,9960	$111,3 \text{ M}^{-1} \pm 0,02$

\*Média  $\pm$  s, número de amostras foi igual a 3; s = desvio padrão



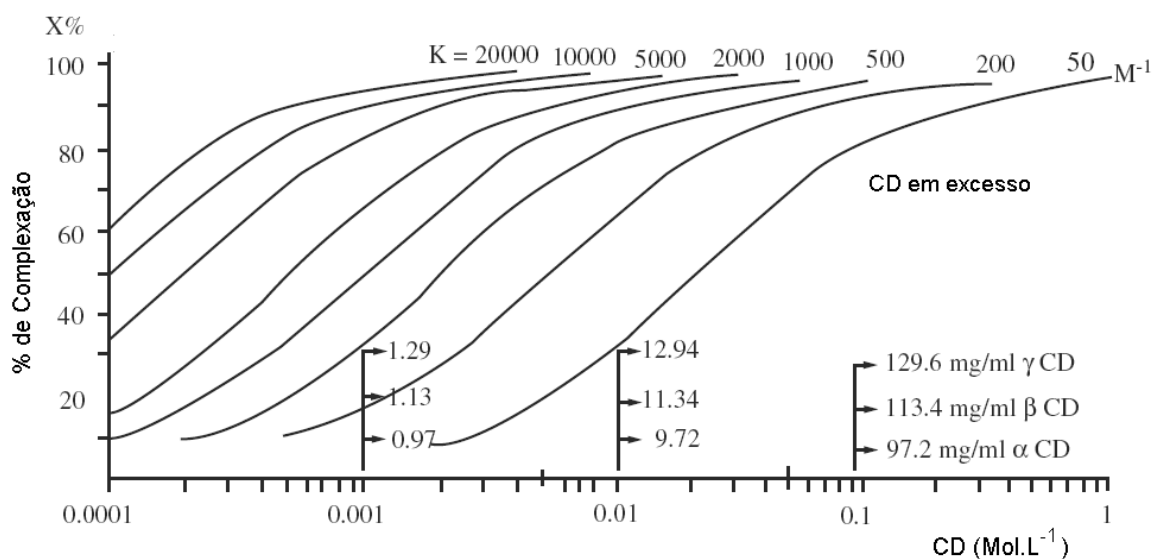


Figura 4.3. Correlação entre porcentagem do fármaco complexado a diferentes ciclodextrinas em função dos fatores diluição e constante de formação. (adaptado de MOSHER & THOMPSON, 2007).

Algumas variáveis permitem justificar os valores reduzidos das constantes de formação do complexo em estudo. A dimensão da cavidade interna da ciclodextrina impõe significativa restrição à inserção de uma molécula hóspede, onde a inclusão dependerá especificamente da flexibilidade conformacional da  $\beta$ -CD, possibilitando muitas vezes apenas a inserção parcial do fármaco em questão. Este sítio de ligação é representado normalmente pela porção mais hidrofóbica do fármaco. Connors (1997) destaca a relação direta existente entre a constante de formação dos complexos de inclusão e o tamanho da cadeia carbônica saturada de alcoóis. Além desta relação podem-se citar outras variáveis como coeficiente de partição  $o/a$ , solubilidade intrínseca, volume molecular da substância a ser incluída, a área superficial da mesma, sua massa molar, dentre outras. Loftsson (2007) destaca que a eficiência de inclusão é maior para substâncias que possuem logaritmo do coeficiente de partição (LOG P) situado entre 1 e 4. No caso de valores de LOG P maiores a inclusão se tornaria cada vez mais ineficiente, o que pode justificar em parte a reduzida taxa de inserção do valsartan na cavidade interna da  $\beta$ -CD. Dados bibliográficos mostram que o valsartan tem LOG P de 4,57 (TSRL INC, 2010). Além do LOG P a solubilidade intrínseca do valsartan, sendo reduzida e menor que  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ , contribui também para reduzir a eficiência de complexação (LOFTSSON, 2007).

Outras variáveis também apresentam relevância e interferência no processo de inclusão como o pH e a temperatura. No que concerne ao pH do meio, mudanças na porcentagem de fármaco ionizado e não ionizado afetam diretamente a interação fármaco:ciclodextrina. Frequentemente a interação se dá mais facilmente quando o fármaco encontra-se no estado não ionizado. Na condição ionizada a constante de formação é normalmente menor (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; YAP et al., 2005). Já a temperatura proporciona normalmente redução dos valores de constante de formação

nos processos exotérmicos, uma vez que elevando a temperatura tem-se aumento da proporção de fármaco livre no meio (MOSHER & THOMPSON, 2007).

Propriedades termodinâmicas, como entalpia e entropia, são importantes para o entendimento da reação de complexação, gerando informações relevantes para a compreensão das interações existentes entre as moléculas do fármaco,  $\beta$ -CD e solvente. A entropia está associada à ligação ou repulsão das forças no sistema, sendo freqüentemente conexa ao arranjo ou desarranjo espacial do complexo formado entre VAL e  $\beta$ -CD (MCMINN et al., 2005). Os estudos de solubilidade permitem também calcular parâmetros termodinâmicos como entalpia, entropia e energia livre de Gibbs. Estes dados podem ser obtidos a partir das constantes de formação do complexo de inclusão em diferentes temperaturas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). A variação de entalpia do processo de formação do complexo de inclusão pode ser determinada a partir da Equação de van't Hoff (Equação 3). Esta Equação considera que a interação hóspede:hospedeiro é um processo em equilíbrio dinâmico onde a variação da entalpia é considerada como uma constante nas temperaturas estudadas. Por outro lado, considerando que o equilíbrio foi alcançado em solução, a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) pode ser determinada pela Equação 2 e a variação da entropia pela Equação 4 (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). Todos os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Média\* dos parâmetros termodinâmicos para o complexo VAL: $\beta$ -CD preparados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.

$\Delta H$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	-24,90 ( $\pm$ 4,88 <sup>a</sup> )
$\Delta S$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	-0,041 ( $\pm$ 0,016 <sup>a</sup> )
$\Delta G$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	-12,42 ( $\pm$ 0,27 <sup>a</sup> )

\*O número de amostras foi igual a 3; a = valor referente ao desvio padrão

O valor de  $\Delta H$  para a complexação entre valsartan e  $\beta$ -ciclodextrina foi de -24,90 KJ.mol<sup>-1</sup> indicando que o processo é exotérmico. Para formação do complexo a cavidade lipofílica acomoda parcialmente o fármaco, sendo que para isso ligações não covalentes são rompidas e estabelecidas com a ciclodextrina. Num primeiro momento moléculas de água, entalpicamente energéticas, são deslocadas da cavidade interna da ciclodextrina para dar lugar ao fármaco. Posteriormente, com inserção da molécula hóspede, são formadas ligações intermoleculares fracas do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio gerando um sistema caracterizado por maior organização, em acordo com o valor de  $\Delta S$  obtido. A redução da entropia do sistema ( $\Delta S = -0,041$  J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) pode ser explicada considerando que a inclusão do valsartan na cavidade lipofílica da  $\beta$ -CD causa redução no grau de liberdade translacional e rotacional do fármaco quando comparado às moléculas não participantes de complexos. Pode-se considerar então que a redução na entalpia é compensada com a redução da entropia, ou seja, no fenômeno ocorrido há compensação entalpia-entropia. Já variação na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) mostra que o processo de formação do complexo pode ser considerado como espontâneo em água. Esta espontaneidade foi maior na temperatura de 25°C ( $\Delta G = -12,66$  KJ.mol<sup>-1</sup>)

em comparação à temperatura de 37°C ( $\Delta G = -12,15 \text{ KJ.mol}^{-1}$ ), ou seja, a inclusão é mais favorável quando a temperatura é reduzida. A espontaneidade é relativamente comum nos processos de complexação de fármacos com ciclodextrina, podendo ser observada em vários estudos termodinâmicos já descritos (XAVIER, 2004; YUEXIAN et al., 2005; CHARUMANEE et al., 2006; FONSECA et al., 2006; SUN et al., 2006; AL OMARI et al., 2006; KARATHANOS et al., 2007; JUN et al., 2007; AHUJA et al., 2007; MORAES et al., 2007; JULLIAN et al., 2008).

#### 4.1.2. Difractometria de raios-X

Os perfis de difração de raios-X de pó para o valsartan,  $\beta$ -CD e compostos de inclusão preparados pelo método de dispersão sólida, pasta e liofilização são apresentados na Figura 4.4 (p.85). O valsartan possui perfil de difração característico de um produto semicristalino como apresentado anteriormente. Já a  $\beta$ -CD mostra-se como um produto policristalino, com picos máximos em  $19,0^\circ 2\theta$ ,  $12,7^\circ 2\theta$  e  $23,0^\circ 2\theta$ , respectivamente. A análise do difratograma de raios-X dos compostos de inclusão preparados permite verificar que há comportamento distinto para os mesmos. Basicamente houve amorfização do produto obtido por dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), enquanto que no produto gerado pela técnica de pasta há significativa cristalinidade. Na mistura física, processo empregado como controle, são observados picos da ciclodextrina indicando a presença da mesma ainda na forma cristalina. Quando um sólido está na condição de produto amorfo temos um material sem nenhuma unidade de repetição e não há interação significativa com moléculas vizinhas, característico de um produto cristalino (HANCOCK, 2007). A ausência desta repetição de subunidades em LIOF e DIS sugere a formação de nova espécie química com características estruturais distintas do valsartan e da  $\beta$ -CD.

A amorfização por si só não é parâmetro para aceitação da inclusão, mas é indício característico deste processo. Para os dois produtos, LIOF e DIS, a liofilização foi a técnica de secagem escolhida para remoção dos solventes, podendo ser também justificativa para amorfização do pó. Processos como liofilização, *spray drying* ou moagem podem induzir amorfização de um sólido por serem altamente energéticos. Especificamente no caso da liofilização, a alta velocidade de congelamento provoca diminuição da movimentação molecular e com a elevação da viscosidade há impossibilidade de ordenação do sistema (HANCOCK, 2007).

Para a Pasta foi observado através do difratograma perfil e presença de picos sugestivos de cristalinidade do sólido. O pico máximo foi identificado em  $12,4^\circ 2\theta$  e associado à  $\beta$ -CD. Através do resultado pode-se sugerir que não houve a formação do complexo entre a  $\beta$ -CD e o valsartan.

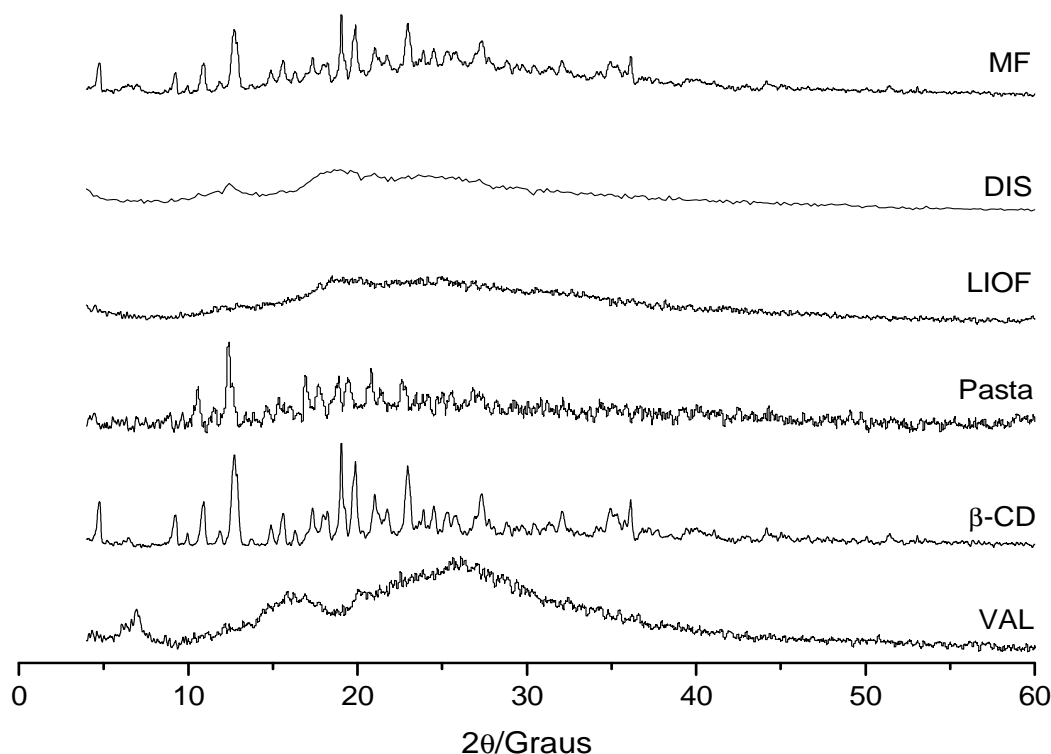


Figura 4.4. Difratograma de raios-X de pó para o valsartan (VAL), β-CD e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS), Pasta e liofilização (LIOF) e mistura física (MF).

#### 4.1.3. Dissolução intrínseca

Para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, sejam elas inovadoras ou não, o estudo de pré-formulação é extremamente útil e determinante para a qualidade final do produto. Nestes estudos busca-se conhecer o fármaco a ser utilizado de forma a prever possíveis problemas e até mesmo sugerir alternativas tecnológicas capazes de contornar dificuldades eminentes. Durante esta etapa de planejamento conhecer o fármaco torna-se relevante, pois é a partir desta caracterização que soluções e justificativas serão apresentadas. Algumas caracterizações comuns podem ser citadas, dentre elas a determinação do tamanho de partícula, a solubilidade do fármaco, a sua área superficial, velocidade de dissolução intrínseca, classificação biofarmacêutica para a dose em estudo e por fim a densidade compactada (GUO et al., 2002; THE UNITED STATES PHARMCPOEIA: USP 31, 2008).

A determinação da dissolução intrínseca torna-se relevante neste contexto, pois permite avaliar propostas de melhora de solubilidade de fármacos que apresentem baixa solubilidade no trato gastrointestinal. Muitos estudos indicam, por exemplo, que apenas a preparação de dispersões sólidas já é suficientemente capaz de proporcionar ganho de solubilidade para fármacos como o ritonavir, um antiretroviral pertencente à BCS IV. A dispersão sólida amorfa contendo este fármaco apresentou dissolução intrínseca dez vezes maior quando comparado ao fármaco cristalino original (BLAGDEN et al., 2007). Caracterizar a dissolução intrínseca garante então avaliar condições ideais

de pH para dissolução, bem como considerar a associação de tensoativos à formulações e caracterizar possíveis interferências do polimorfismo na performance de dissolução do fármaco.

A partir deste contexto é interessante então avaliar os complexos contendo valsartan e  $\beta$ -ciclodextrina a fim de determinar o possível ganho na velocidade de dissolução intrínseca do fármaco. O meio de dissolução escolhido foi tampão fosfato pH 6,8 a 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. Os perfis de dissolução (Figura 4.5) e os resultados da dissolução intrínseca estão apresentados na Tabela 4.3.

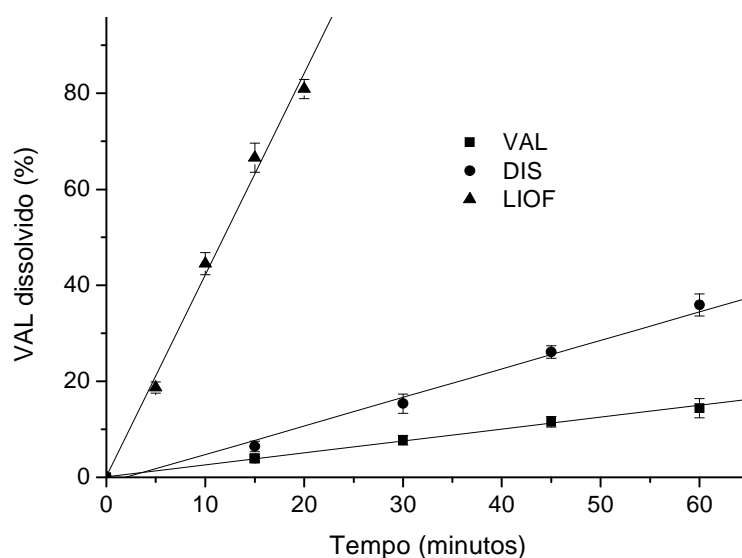


Figura 4.5. Dissolução intrínseca para o valsartan (VAL) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF) (O número de amostras foi igual a 3).

Os resultados para o estudo de dissolução intrínseca do valsartan e de seus complexos indicaram que a presença da ciclodextrina associada ao fármaco proporcionou ganho significativo de solubilidade para o mesmo. Comparando o fármaco puro ao complexo obtido por dispersão sólida verifica-se elevação significativa da solubilidade do valsartan em 2,4 vezes. Já para o fármaco complexado à  $\beta$ -CD pela técnica de liofilização houve aumento da taxa de dissolução em 16,9 vezes. Esta elevação na velocidade de dissolução seria interessante então para que fosse possível mais rápida solubilização do fármaco no trato gastrointestinal elevando assim a biodisponibilidade do valsartan.

Tabela 4.3. Regressão linear, coeficiente de correlação linear (R) e dissolução intrínseca para o valsartan e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF)\*.

	Equação linear	R	Dissolução intrínseca (mg.min <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )
VAL	y = 0,2481x + 0,1183	0,9996	1,0 (± 0,012 <sup>a</sup> )
DIS	y = 0,5940x - 1,1834	0,9981	2,4 (± 0,018 <sup>a</sup> )
LIOF	y = 4,1940x + 0,2000	0,9962	16,8 (± 0,520 <sup>a</sup> )

\*O número de amostras foi igual a 3; <sup>a</sup>s = desvio padrão

Estudos de dissolução intrínseca realizados com piroxicam complexado à  $\beta$ -CD, na proporção de 1:2,5, também indicaram ganho de solubilidade quando este adjuvante foi associado ao fármaco. O piroxicam complexado por liofilização e *spray drying* apresentou dissolução intrínseca equivalente a, respectivamente, 1,9 e 4,8 vezes maiores no pH 1,2, meio este que simula a condição estomacal do organismo humano. Já no pH que mimetiza a condição intestinal o ganho também foi observado mas em proporção menor, sendo 1,2 vezes maior para o complexo obtido por liofilização e 2,0 vezes superior no caso do material obtido por *spray drying* (THE NINTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS, 1999; VAN HEES, 2002). Obaidat e colaboradores (2009) também descreveram o ganho dissolução intrínseca para complexos de meloxicam e  $\beta$ -CD, destacando a significativa elevação da velocidade de dissolução do complexo obtido pelo método da pasta e *spray drying*.

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

A Figura 4.6 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho para a  $\beta$ -CD e a Tabela 4.4 (p.88) mostra a atribuição dos principais sinais observados no espectro. Na Figura 4.7 (p.88) estão os espectros de infravermelho para o valsartan,  $\beta$ -CD, compostos de inclusão e mistura física.

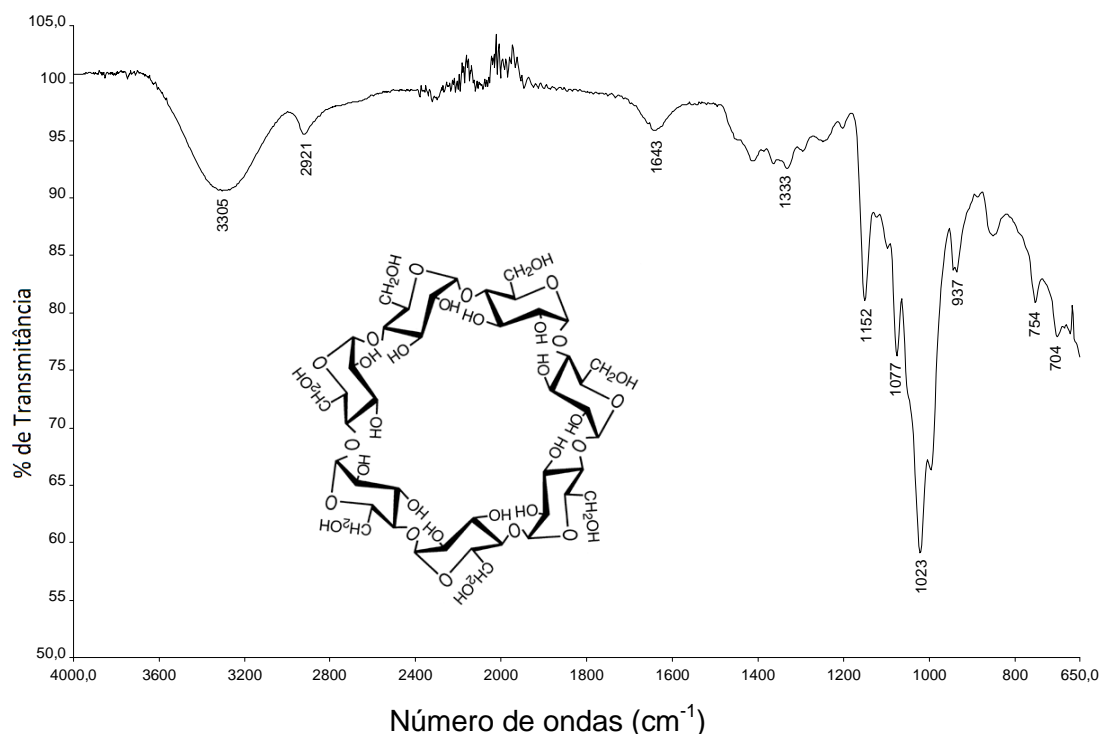


Figura 4.6. Espectro de absorção na região do infravermelho para a  $\beta$ -ciclodextrina.

Tabela 4.4. Principais bandas de absorção observadas no espectro infravermelho da  $\beta$ -ciclodextrina

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições*
3305	Estiramento O-H
2921	Deformação O-H da água
1300 - 1400	Deformação C-H
1023	Estiramento de C-O-C
650 - 800	Deformação O-H

\* SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. 1997

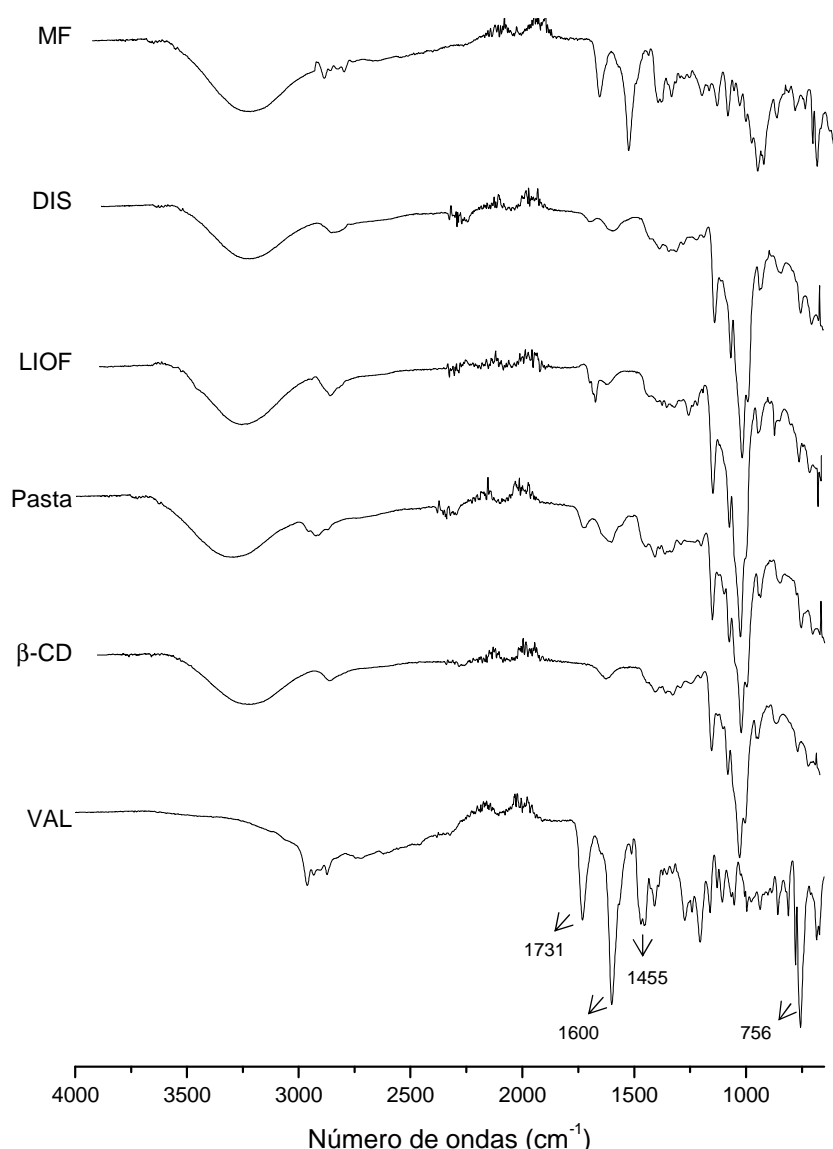


Figura 4.7. Comparação dos espectros absorção na região do infravermelho para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS), pasta (Pasta) e liofilização (LIOF), e mistura física entre valsartan e  $\beta$ -CD (MF).

Através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho observa-se que há interação entre a  $\beta$ -CD e o valsartan, caracterizado pela supressão de sinais específicos do fármaco. Um exemplo disso são as bandas de  $\nu_{(C=O)}$ , de ácido carboxílico e amida, em  $1731\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  que tem sua intensidade diminuída tanto para os compostos preparados pelo método da Pasta, DIS e LIOF sugerindo a interação hóspede-hospedeiro. Essas mesmas bandas são observadas no espectro da MF embora com menor intensidade em função da diluição do fármaco e grande volume molar da  $\beta$ -CD. Outros sinais que permitem avaliar a possível complexação são o estiramento assimétrico e simétrico –  $\nu_{(C-H)}$  – em  $2962\text{ cm}^{-1}$  e  $2873\text{ cm}^{-1}$ . Ambos mostram-se suprimidos na Pasta, DIS e LIOF, mas mantêm-se nítidos na MF. Além destes dois casos, um terceiro e quarto sinal também tem sua intensidade diminuída após associação do valsartan com a  $\beta$ -CD, seria a banda em  $1455\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento  $\nu_{(C=C)}$  e a  $\delta_{(C-H)}$  do anéis aromáticos “b” e “c” na região de  $756\text{ cm}^{-1}$ , ambos os sinais reforçam a interação hóspede-hospedeiro.

A partir dos resultados de espectroscopia de absorção no Infravermelho podem-se esperar três possíveis sítios de interação da  $\beta$ -CD com o valsartan, conforme apresentado na Figura 4.8: anel aromático, ácido carboxílico e o grupo amida.

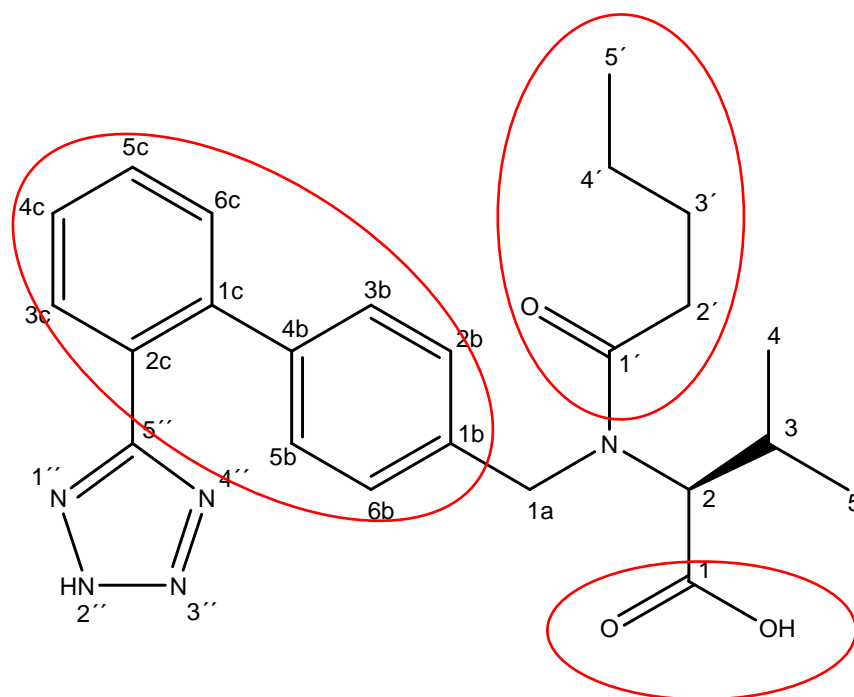


Figura 4.8. Possíveis sítios de interação do valsartan com a  $\beta$ -CD conforme resultados obtidos por espectroscopia de absorção no infravermelho.

Complexos gerados entre diferentes ciclodextrinas e o valsartan já foram descritos na bibliografia e em todos os casos a espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi empregada como técnica para caracterização dos produtos gerados. Capello (2006) propôs-se a preparar e avaliar complexos entre valsartan e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina obtidos por liofilização e mistura física. Após caracterização por FTIR observou-se deslocamento nas bandas referentes à



$\nu_{(C=O)}$  da amida e do ácido carboxílico. O fármaco apresenta uma banda em  $1605\text{ cm}^{-1}$  relacionada à  $\delta_{(C=O)}$  da amida e no complexo obtido por liofilização esta banda foi deslocada para  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Para o  $\nu_{(C=O)}$  do ácido carboxílico esta variação foi de  $1732\text{ cm}^{-1}$  para  $1723\text{ cm}^{-1}$ . Para a mistura física sugerida não houve variação significativa entre as bandas de absorção avaliadas. Estes dados corroboram que há interação entre o valsartan e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina no complexo obtido por liofilização. Considerações semelhantes foram relatadas por Pravin e colaboradores (2009), também baseadas no deslocamento de bandas referentes à  $\nu_{(C=O)}$  da amida e do ácido carboxílico do valsartan. O complexo foi gerado pelas técnicas de pasta e solubilização com sonicação e a ciclodextrina empregada foi a metil- $\beta$ -ciclodextrina.

Yap e colaboradores (2005) avaliaram por espectroscopia na região do infravermelho complexos de ácido retinóico e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, observando que na mistura física sinais característicos do fármaco como  $\nu_{(C=O)}$  na região de  $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{(C-O)}$  na região de  $1300 - 1100\text{ cm}^{-1}$  mantiveram-se nítidos enquanto que no composto de inclusão os mesmos não foram observados. A supressão das bandas referentes à  $\nu_{(C=O)}$  e  $\nu_{(C-O)}$  foi considerado como indicador da inclusão do ácido retinóico na cavidade hidrofóbica da HP- $\beta$ -CD.

#### 4.1.5. Análise térmica

As curvas TG e DTG para o valsartan,  $\beta$ -ciclodextrina, compostos de inclusão e mistura física estão representadas na Figura 4.9 (p.91). A curva TG para a  $\beta$ -ciclodextrina apresenta uma perda de massa de 12,5% na faixa de  $30^\circ$  a  $95^\circ\text{C}$  referente à perda de oito moléculas de água presentes na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina (ORGOVÁNYI et al., 2005). Após este primeiro evento verifica-se um patamar de estabilidade térmica até  $350^\circ\text{C}$  aproximadamente. O próximo fenômeno acontece em seguida havendo perda total de massa indicando completa decomposição da  $\beta$ -ciclodextrina em temperatura próxima a  $700^\circ\text{C}$  (BETTINETTI et al., 2002; GIORDANO et al., 2001).

Nos estudos térmicos dos complexos obtidos pela técnica de pasta e dispersão sólida, além da mistura física preparada entre a  $\beta$ -ciclodextrina e o valsartan, não houve geração de resíduo sólido ao final da análise, indicando completa decomposição dos compostos. No caso do complexo obtido por liofilização houve geração de resíduo sólido correspondendo a  $7,84\% \pm 1,18$  do total da amostra. Este resíduo trata-se possivelmente o óxido de potássio, sendo o potássio proveniente do hidróxido de potássio utilizado para ajuste do pH da solução que gerou o liofilizado.

Quando considerada a estabilidade térmica dos complexos preparados verifica-se que os complexos preparados por DIS e LIOF apresentam estabilidade térmica entre  $100^\circ\text{C}$  e  $200^\circ\text{C}$  quando comparados à VAL Figura 4.9 (p.91). MF e Pasta não apresentaram o referido aumento de estabilidade térmica, sugerindo que a complexação pode ter ocorrido em LIOF e DIS com formação de uma nova estrutura supramolecular.

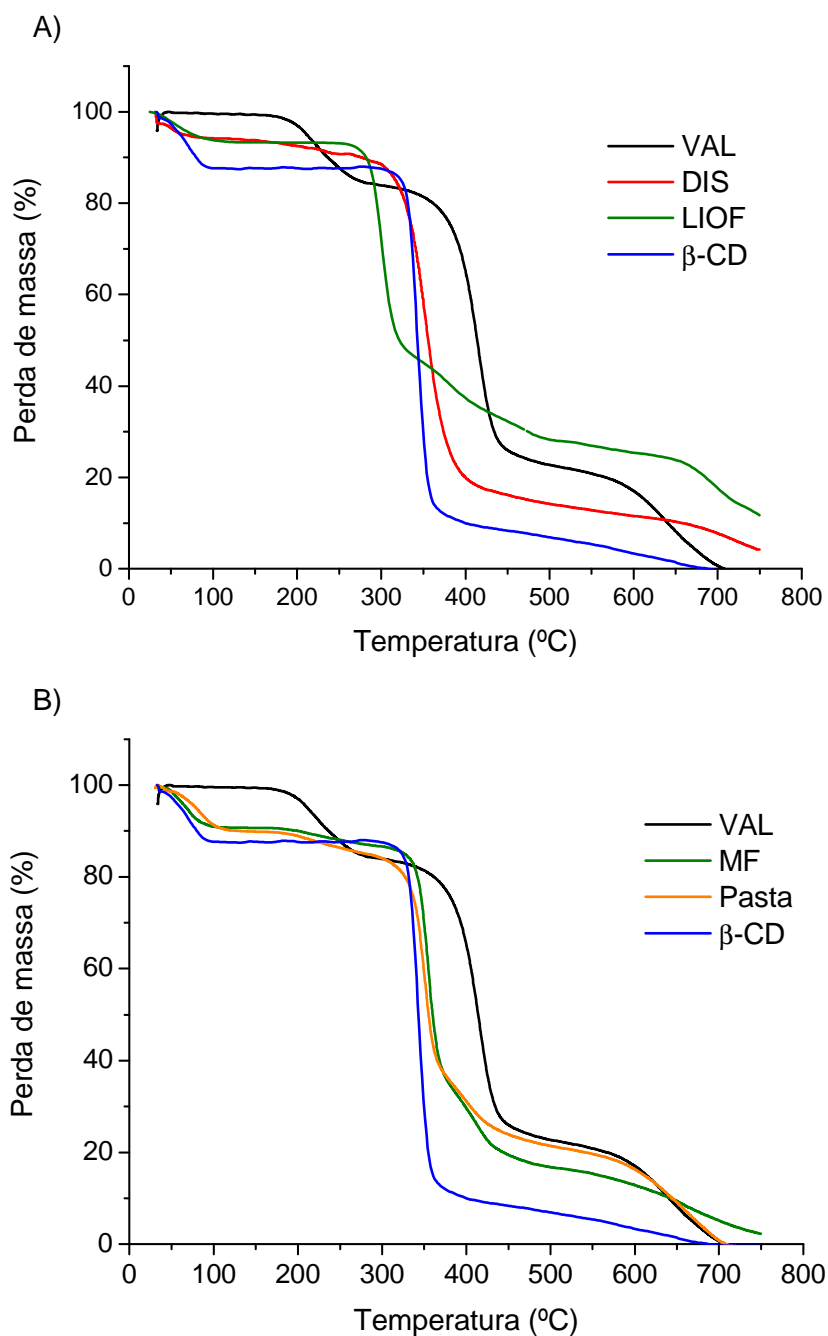


Figura 4.9. A) Curvas TG para β-ciclodextrina (β-CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas TG para β-CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e β-CD (MF). Análises feitas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

Os fenômenos ocorridos com todas as amostras foram sumariados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Eventos observados nas curvas TG obtidas para o valsartan,  $\beta$ -CD, complexos e mistura física.

Amostras*	1º evento		2º evento		3º evento	
	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda
$\beta$ -CD	30 – 95	12,5	35 - 700	87,5	-	-
VAL	34 – 314	12,6	314 - 506	61,2	506 - 748	24,0
LIOF	35 – 90	9,4	247 - 495	65,7	527 - 750	7,0
DIS	33 – 743	92,7	-	-	-	-
Pasta	34 – 144	9,2	144 - 393	57,2	393 - 745	33,5
MF	26 – 160	10,5	160 - 463	67,2	463 - 746	20,3

\*Legenda:  $\beta$ -CD:  $\beta$ -ciclodextrina, VAL: valsartan, DIS: complexo obtido por dispersão sólida, Pasta: complexo obtido pela técnica da pasta, LIOF: complexo obtido pela técnica de liofilização, MF: mistura física entre valsartan e  $\beta$ -CD.

A partir dos dados pode-se observar um primeiro evento com perda de massa entre 9,2 e 12,6% para LIOF, Pasta e MF, atribuída à presença de água na mistura, principalmente no caso da Pasta onde o solvente foi seco a 40°C apenas, não possibilitando assim completa remoção do solvente. O mesmo acontece com a MF já que o produto não foi seco e contém água proveniente da  $\beta$ -CD e fármaco. A presença de água no LIOF não era esperada visto que o produto foi liofilizado, mas por se tratar de um produto amorfo pode ter ocorrido absorção de água do meio, visto que é inerente ao pó amorfo absorver água (HANCOCK, 2007).

Dentre todos os complexos a DIS foi distinta, pois apresenta um perfil que se distancia do perfil do fármaco e da  $\beta$ -CD, ou seja, não são observadas as decomposições características de cada um, sugerindo a presença de uma nova espécie. Através das curvas DTG mostradas na Figura 4.10 (p.93) para as mesmas amostras, verifica-se da mesma forma que para DIS há apenas um único evento de decomposição, com velocidade máxima de ocorrência em 350°C. Ainda para DIS não são identificados sinais característicos de perda de massa para o valsartan e há também alargamento do sinal de perda de massa para a  $\beta$ -CD que ocorre entre 300°C e 420°C. Para os outros complexos observa-se mais de um evento de decomposição da mistura, indicando novamente menor grau de interação com a  $\beta$ -CD e a presença de várias espécies compondo o produto. Na mistura física, onde as interações do valsartan e  $\beta$ -CD são mínimas, verificam-se isoladamente os fenômenos de decomposição ocorridos com cada um, havendo apenas superposição das curvas DSC do valsartan e  $\beta$ -CD. Na Pasta a curva DTG se assemelha à curva da MF onde se pode identificar a presença do evento de decomposição do fármaco e da  $\beta$ -CD, ou seja, as espécies ainda se encontram possivelmente presentes sugerindo que a inclusão não foi observada.

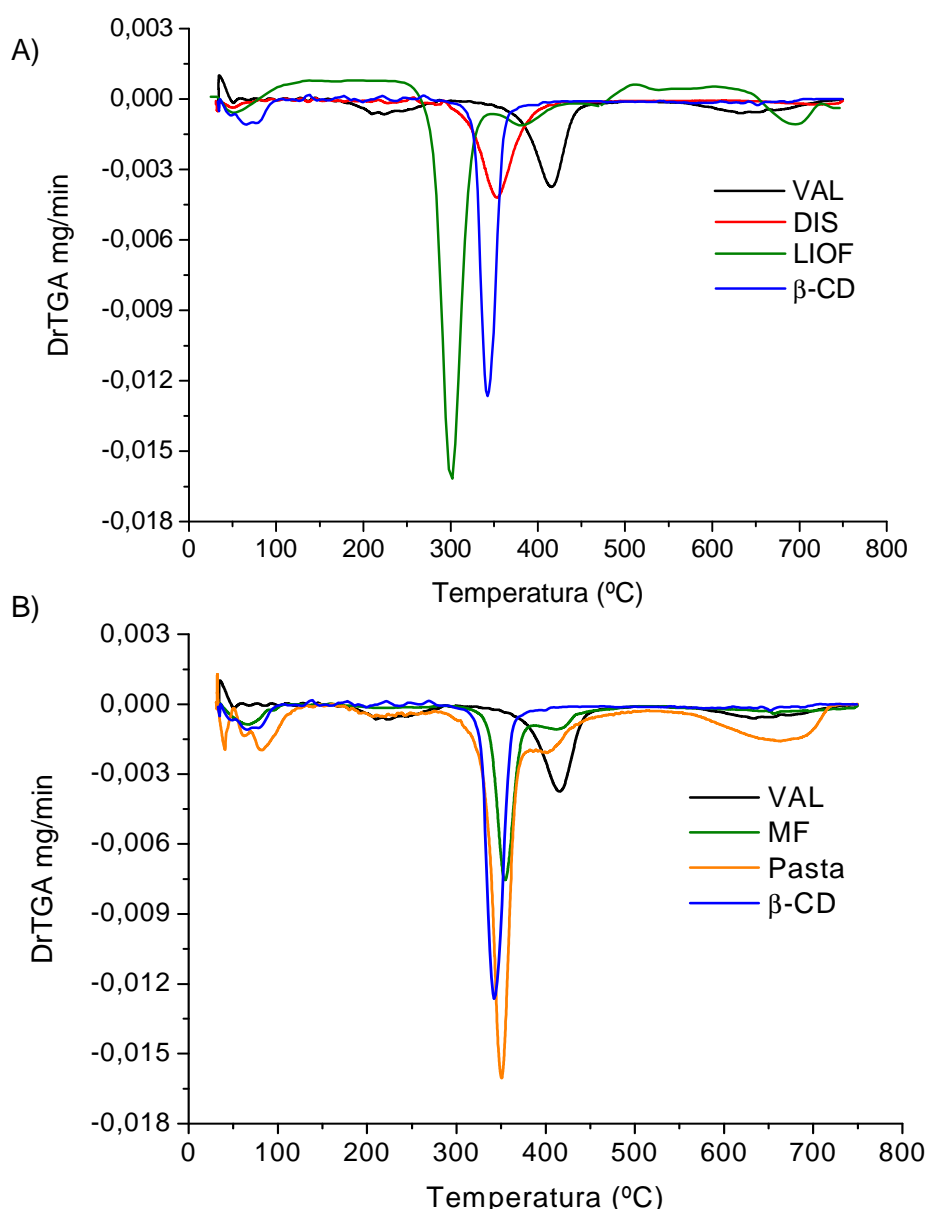


Figura 4.10. A) Curvas DTG para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas DTG para  $\beta$ -CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e  $\beta$ -CD (MF).

Outra técnica empregada para caracterização dos complexos foi a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). O perfil das curvas de DSC para as amostras está representado na Figura 4.11 (p.94). Pela curva DSC do valsartan a fusão do fármaco foi identificada em 100,5°C. O desaparecimento deste pico de fusão do fármaco serve como sonda para monitorar a formação dos compostos de inclusão. Avaliando as curvas DSC apresentadas apenas na MF foi identificada a fusão do valsartan. Na DIS, LIOF e na Pasta este pico endotérmico de fusão do valsartan não é percebido.

A análise da curva DSC da  $\beta$ -CD indica a presença de fenômeno endotérmico típico em 215°C caracterizado por transição de fase, sem perda de massa, seguido por outro evento endotérmico com velocidade máxima de ocorrência em 325°C, característico da decomposição da  $\beta$ -CD (BETTINETTI

et al., 2001; GIORDANO et al., 2001). Através da alteração deste sinal pode-se fazer extrapolação a respeito da interação entre o fármaco e a ciclodextrina nos complexos formados. Em todos os casos analisados a alteração máxima deste sinal acontece no LIOF e DIS seguido por fim pela Pasta. Analisando ainda a curva DSC da Pasta e da  $\beta$ -CD nota-se uma banda endotérmica em 67,1<sup>o</sup> e 66,0<sup>o</sup>C, respectivamente, associada à perda de água para as duas amostras. Este evento não é notado para DIS e LIOF visto que os mesmos foram liofilizados para remoção do solvente. Ainda para LIOF percebe-se na região de 300<sup>o</sup>C a 350<sup>o</sup>C pico exotérmico. Nesta região esperava-se apenas o fenômeno endotérmico de fusão seguida de decomposição da  $\beta$ -CD. A possível formação do complexo pode justificar tal evento, onde o balanço energético entre fenômenos exotérmicos e endotérmicos tiveram como resultado a liberação de calor e não a absorção.

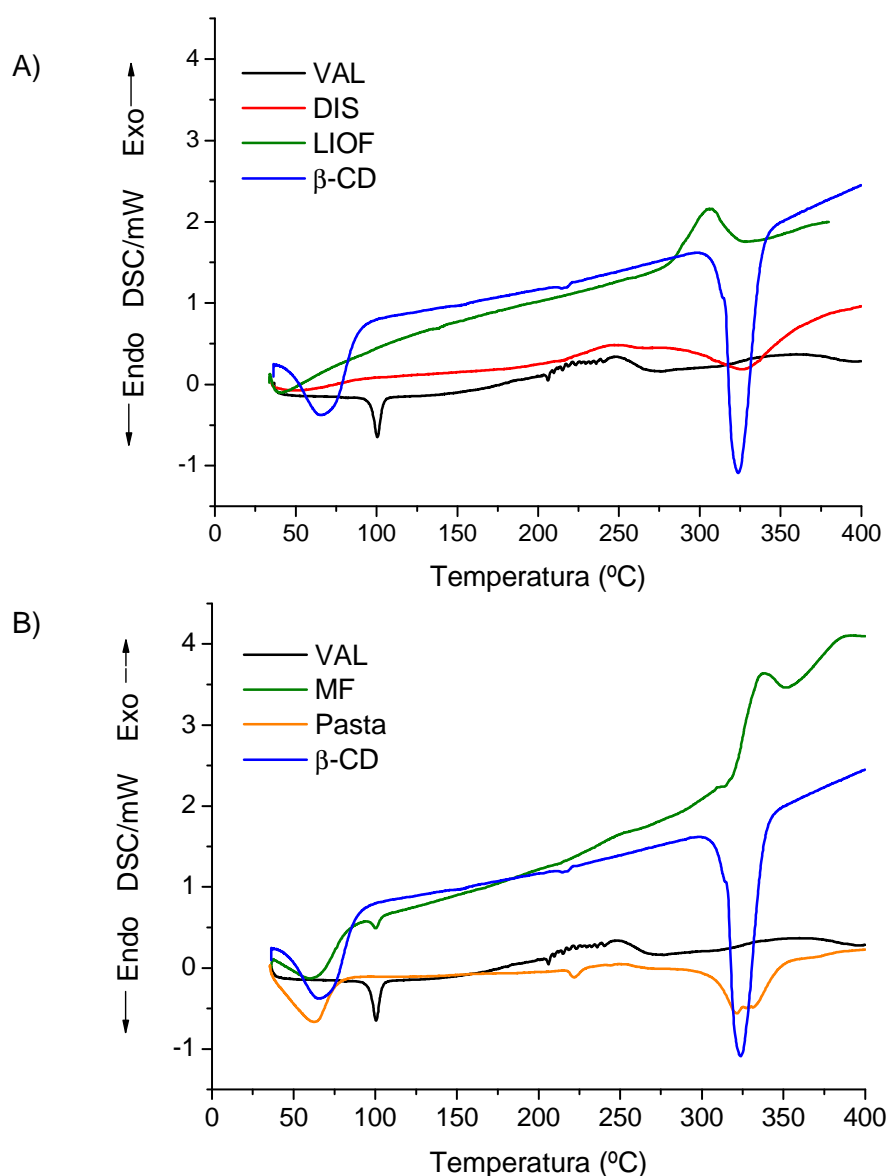


Figura 4.11. A) Curvas DSC para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), valsartan (VAL), complexos obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e liofilização (LIOF), e B) Curvas DSC para  $\beta$ -CD, VAL, complexo preparado pela técnica de pasta (Pasta) e mistura física entre valsartan e  $\beta$ -CD (MF). Análises feitas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>.

## 4.1.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das técnicas mais empregadas para caracterização e elucidação estrutural de moléculas orgânicas, tanto no estado sólido quanto em solução. Para caracterização dos complexos formados entre uma molécula hóspede e ciclodextrinas, seu uso também é crescente visto que é possível caracterizar forças e modos de ligação presentes nas complexações, determinadas por interações não covalentes entre duas ou mais moléculas. Nos trabalhos mais antigos a interpretação das complexações restringia-se à observação de hidrogênios específicos e a alteração de seu deslocamento químico quando comparados os espectros da ciclodextrina, fármaco e complexo entre ambos. O fenômeno de complexação altera por sua vez a distribuição eletrônica sobre os núcleos de grupos funcionais envolvidos na complexação, alterando o momento magnético nuclear resultante sobre estes mesmos núcleos. O resultado deste fenômeno é expresso no espectro com uma variação do deslocamento químico do hidrogênio ou carbono. Os efeitos de deslocamentos químicos após inclusão na cavidade das ciclodextrinas, são limitados a décimos de ppm, uma vez que na formação do composto de inclusão não ocorre estabelecimento de ligações covalentes, alterando assim a polaridade do composto após magnetização, produzindo fracos efeitos tensores de deslocamento (SCHNEIDER et al., 1998). Atualmente os métodos 2D, que exploram os efeitos nucleares Overhauser, são mais empregados por proporcionarem mais efetiva interpretação e caracterização da complexação. Em função dos confórmeros para o valsartan foram realizados experimentos de 2D-ROESY em DMSO- $d_6$  e não os unidimensionais com objetivo de observar correlações espaciais permitindo elucidação das possíveis interações entre a  $\beta$ -CD e o valsartan.

O espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  para a  $\beta$ -CD (Figura 4.12) está apresentado na Figura 4.13 (p.96) e a atribuição para os hidrogênios está discriminada na Tabela 4.6 (p.96) e foi baseada na descrição de Schneider e colaboradores (1998). Através do espectro podem ser observados os hidrogênios da cavidade interna e externa da  $\beta$ -CD.

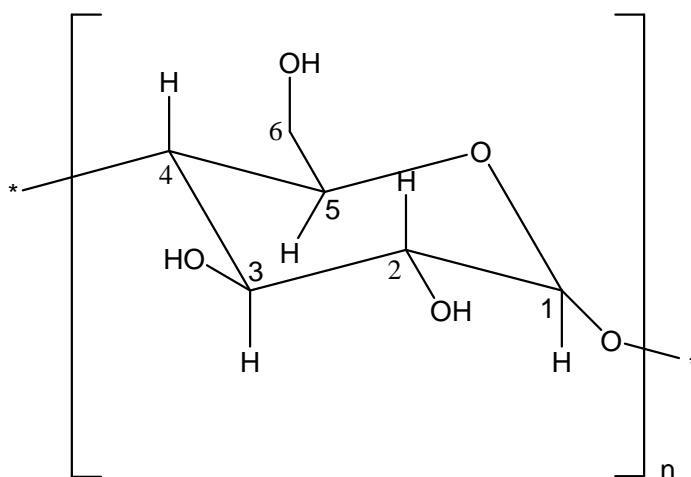


Figura 4.12. Monômero de glicopiranoose que compõe a  $\beta$ -CD.

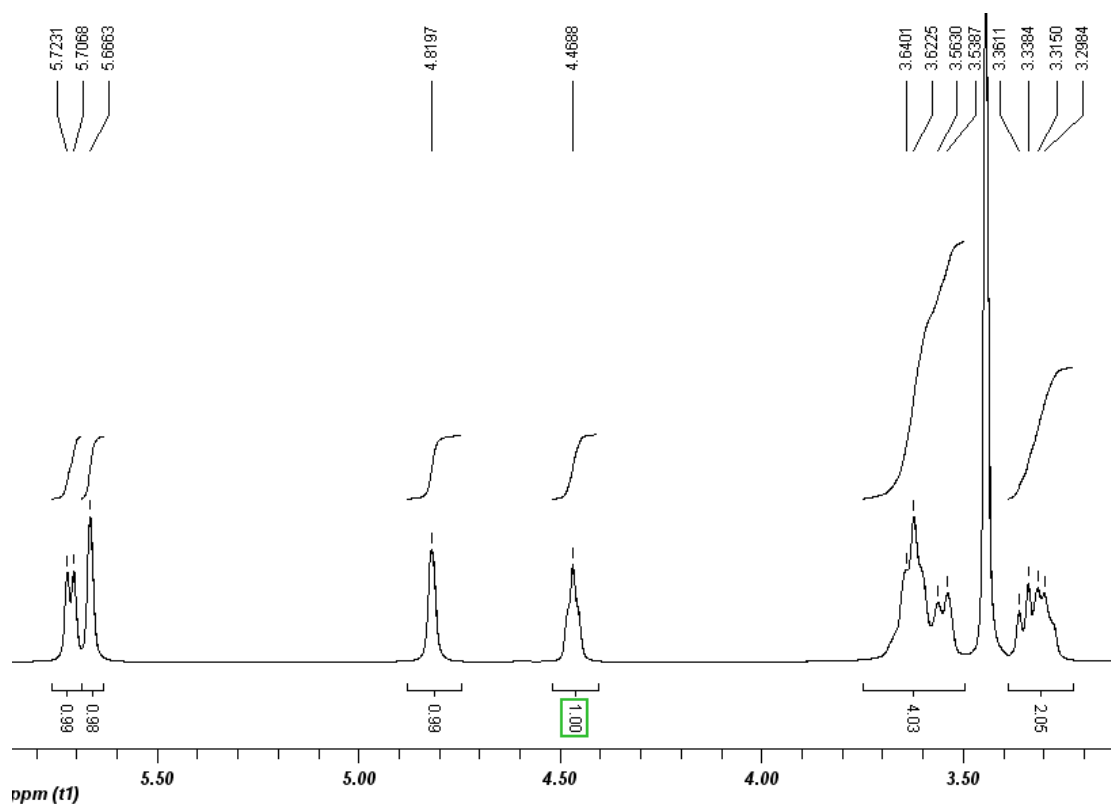


Figura 4.13. Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a  $\beta\text{-CD}$ .

Tabela 4.6. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a  $\beta\text{-CD}$ .

Hidrogênio	( $\delta$ ) (ppm)	Hidroxila	( $\delta$ ) (ppm)
H1	4,8197	OH 2	5,7145
H2	3,3498	OH 3	5,6663
H3	3,6225	OH 6	4,4688
H4	3,3067		
H5	3,5509		
H6	3,6401		

As Figuras 4.14 (p.97), 4.15 (p.98) e 4.16 (p.99) apresentam os experimentos 2D-ROESY para os compostos de inclusão entre o valsartan e  $\beta\text{-CD}$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

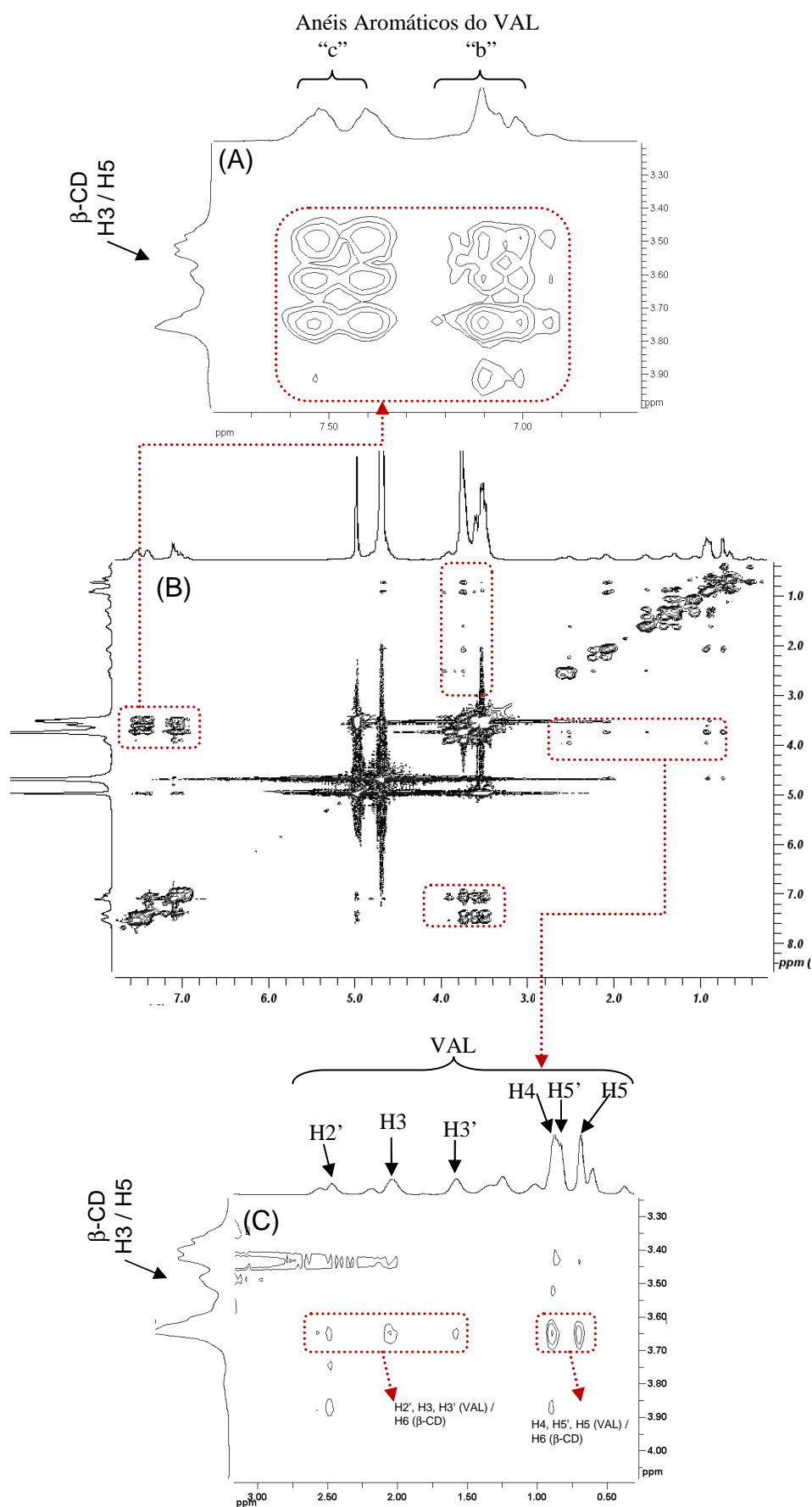


Figura 4.14. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão LIOF, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.



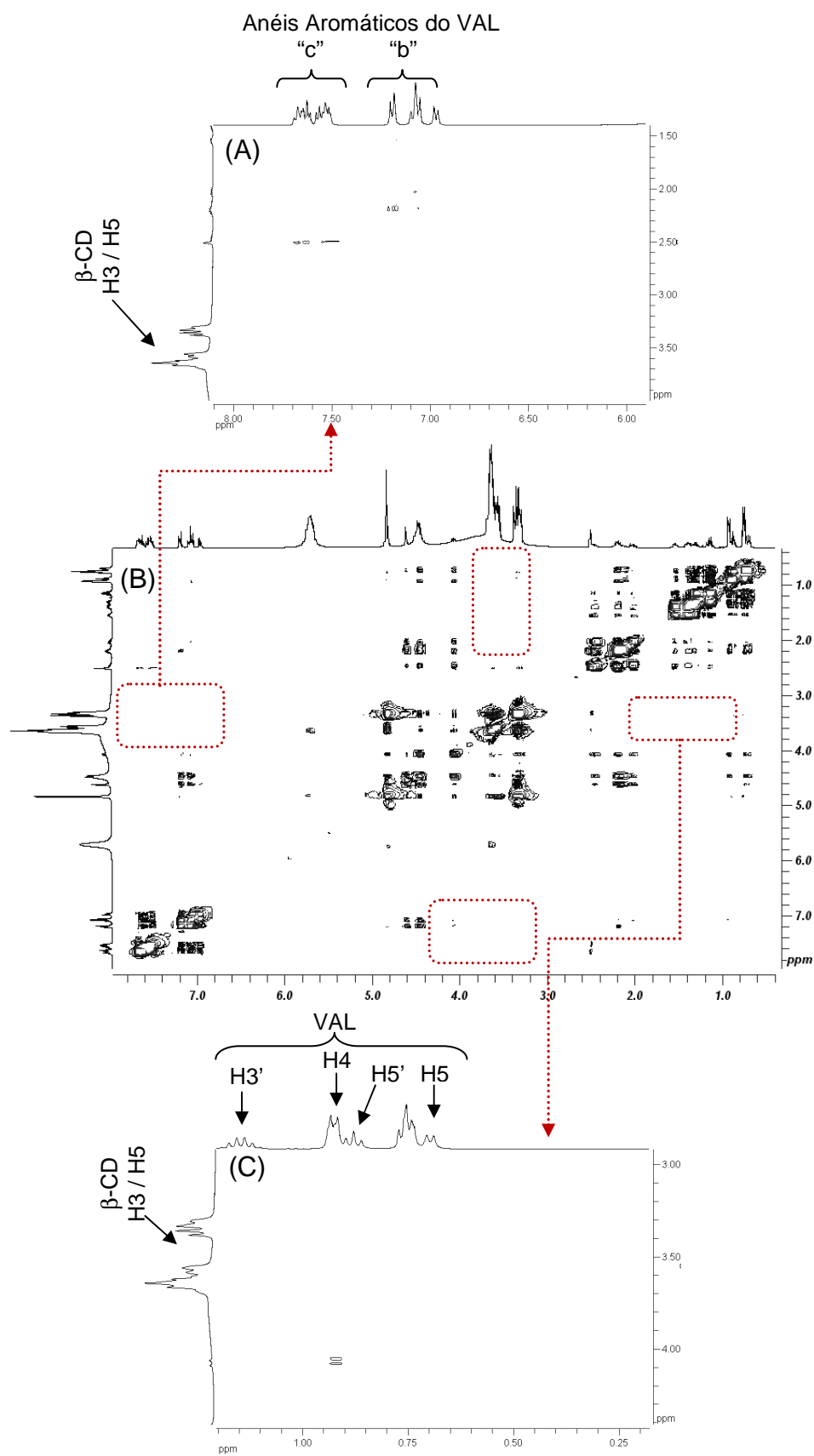


Figura 4.15. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão Pasta, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.

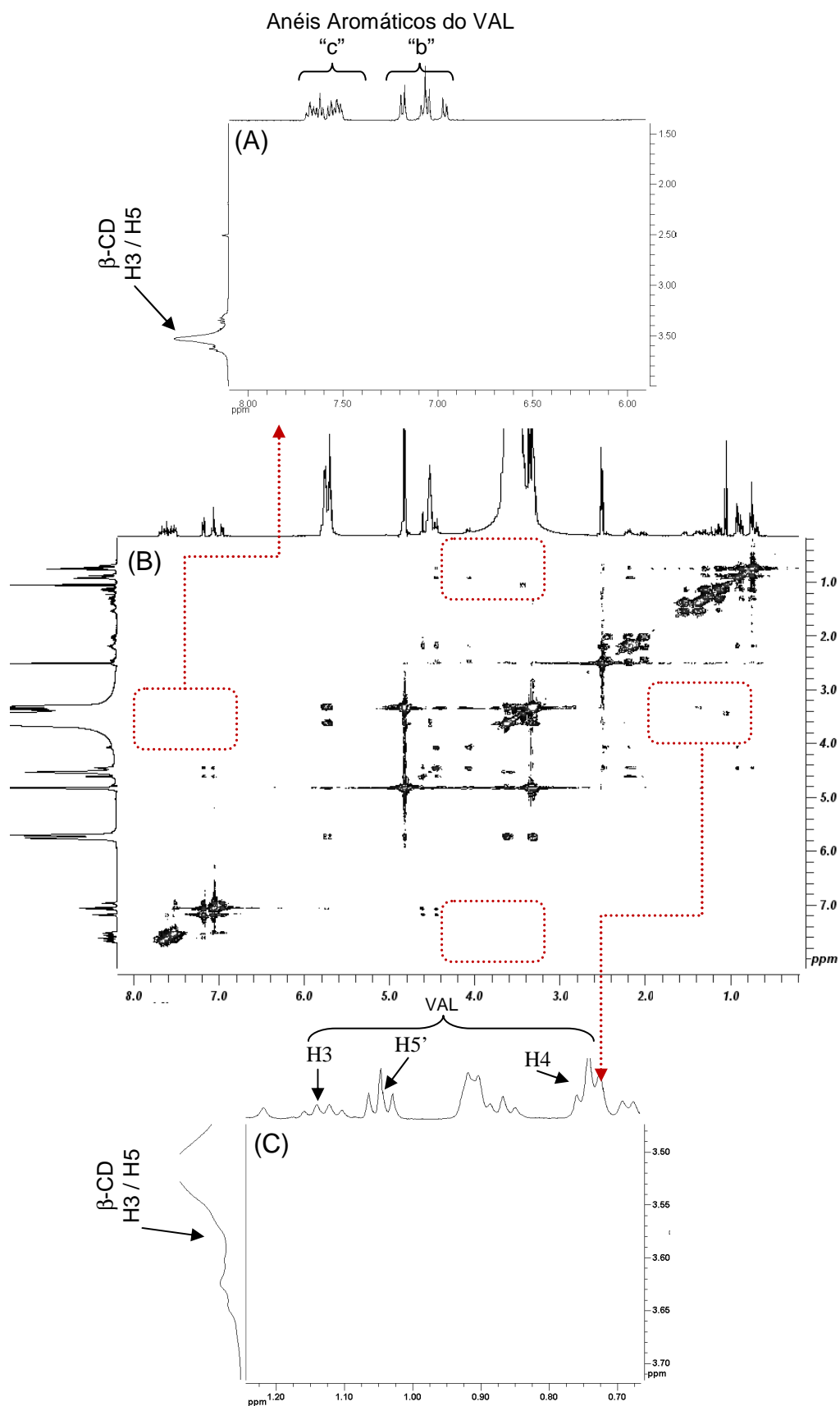


Figura 4.16. (A) e (C) Ampliação de segmentos do mapa de contornos 2D-ROESY (B) obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão DIS , na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.

Analisando as Figuras 4.14 (p.97), 4.15 (p.98) e 4.16 (p.99), pode-se observar que não há interação entre o valsartan e  $\beta$ -CD complexados pelas técnicas de pasta (Figura 4.15, p.98) e dispersão sólida (Figura 4.16, p.99) e que apenas pela técnica de liofilização (Figura 4.14, p.97) conseguiu-se preparar um composto de inclusão entre o valsartan e a  $\beta$ -CD. Verifica-se neste caso uma correlação espacial no mapa 2D ROESY indicando a interação dos hidrogênios H3 e H5 da cavidade interna da ciclodextrina com a molécula do valsartan. Houve significativa correlação com os hidrogênios H3 e H5 da  $\beta$ -CD com os anéis aromáticos “b” e “c” do valsartan. A partir desta análise é possível avaliar que a complexação ocorreu possivelmente na proporção de 1:1. A interação da  $\beta$ -CD com valsartan através dos anéis aromáticos de VAL foi sugerida por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, onde houve supressão das bandas em  $1455\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento  $\nu_{(C=C)}$  e a  $\delta_{(C-H)}$  do anel aromático “c” na região de  $756\text{ cm}^{-1}$ . A Figura 4.17 apresenta então o sítio de complexação identificado e caracterizado por RMN.

Outras correlações (Figura 4.14, p.97) também foram observadas entre o H6 da  $\beta$ -CD com os grupamentos metila e grupo amida representados, respectivamente, pelos carbonos e hidrogênios H3, H4, H5 e H2', H3', H4', H5' do fármaco. Outra situação interessante é que especialmente para a dispersão sólida pode ter ocorrido equilíbrio dinâmico do composto de inclusão na solução, acontecendo possível competição do valsartan e do  $\text{DMSO-}d_6$  pela cavidade lipofílica da ciclodextrina, diminuindo assim a interação entre o valsartan e a  $\beta$ -CD em solução e eliminando possíveis correlações espaciais a serem identificadas por RMN.

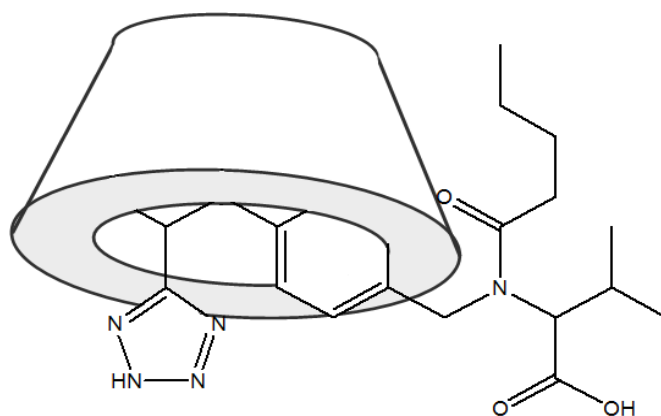


Figura 4.17. Sítio de complexação entre o valsartan e a  $\beta$ -CD determinado por 2D-ROESY indicando a possível formação do complexo na razão molar 1:1.

#### 4.1.7. Ação antagonista do complexo VAL: $\beta$ -CD no efeito pressor da angiotensina II

Durante condução de todo o experimento *in vivo* foram coletados dados da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais de cada grupo de trabalho. O primeiro grupo recebeu dose única do valsartan e o segundo grupo recebeu dose equivalente do valsartan na forma de composto de inclusão, obtido pela técnica de liofilização (LIOF). A partir dos dados individuais de pressão arterial de cada animal, coletados a cada dez minutos, antes e após administração do fármaco, foi calculada a diferença absoluta em relação à pressão arterial média (PAM) do período controle. Sendo assim foi pesquisada a capacidade de redução da pressão arterial (PA) após administração de cada um dos produtos em teste. Os resultados e as Figuras mostram numericamente qual foi a redução da PA dos animais.

A dose de valsartan foi de  $1,14 \text{ mg.kg}^{-1}$  equivalente à uma administração de 80 mg do fármaco em um indivíduo adulto com peso de setenta quilos. Com a administração em dose única do valsartan, observando a Figura 4.18 (p.102), o fármaco foi capaz de proporcionar redução significativa da PA dos ratos nos dois primeiros dias seguidos à gavagem ( $p < 0,05$ ). A capacidade média de redução da PA nestes dois dias foi equivalente a  $-4,00 \text{ mm Hg} \pm 0,36$ . Como mostrado na Figura 4.18 (p.102), no primeiro dia a PA foi reduzida em  $-4,65 \text{ mm Hg} \pm 0,67$  e no segundo dia esta redução foi em média igual a  $-3,97 \text{ mm Hg} \pm 0,42$ . Não há diferença significativa entre a redução da PA no primeiro e segundo dia ( $p > 0,05$ ).

Para a administração do complexo de inclusão LIOF a dose de VAL foi de  $1,14 \text{ mg.kg}^{-1}$  equivalentes a  $4,22 \text{ mg.kg}^{-1}$  de LIOF. Foi possível observar a maior efetividade do composto de inclusão na redução da PA dos animais. Para o LIOF o efeito de redução da pressão arterial foi mais duradouro, chegando a bloquear significativamente os receptores da angiotensina II por quatro dias e não apenas dois conforme VAL administrado sozinho. Nestes quatro dias a média de redução da pressão arterial foi de  $-5,17 \text{ mm Hg} \pm 0,38$ . Quando se faz a comparação apenas dos dois primeiros dias de resultados pressóricos este valor chegou a diminuir  $-9,38 \text{ mm Hg} \pm 0,58$ , ou seja, 2,3 vezes mais eficaz do que o valsartan sozinho. Significa dizer então que a ação do composto de inclusão LIOF foi mais efetiva e prolongada do que a ação do valsartan.

Comparando-se individualmente os dados destes primeiros quatro dias seguidos à gavagem de LIOF tem-se que no primeiro dia a redução da pressão chegou a  $-11,16 \text{ mm Hg} \pm 0,92$ , no segundo dia  $-8,64 \text{ mm Hg} \pm 0,73$ , no terceiro dia  $-2,53 \text{ mm Hg} \pm 0,75$  e no quarto dia  $-1,89 \text{ mm Hg} \pm 0,62$ . Do ponto de vista estatístico não há diferença significativa dos resultados de redução da PA no primeiro e segundo dia ( $p > 0,05$ ), assim como são comparadas as médias de PA do terceiro e quarto dias ( $p > 0,05$ ). Para estes dados a diferença existe quando comparados os resultados do segundo e terceiro dia ( $p < 0,0001$ ).

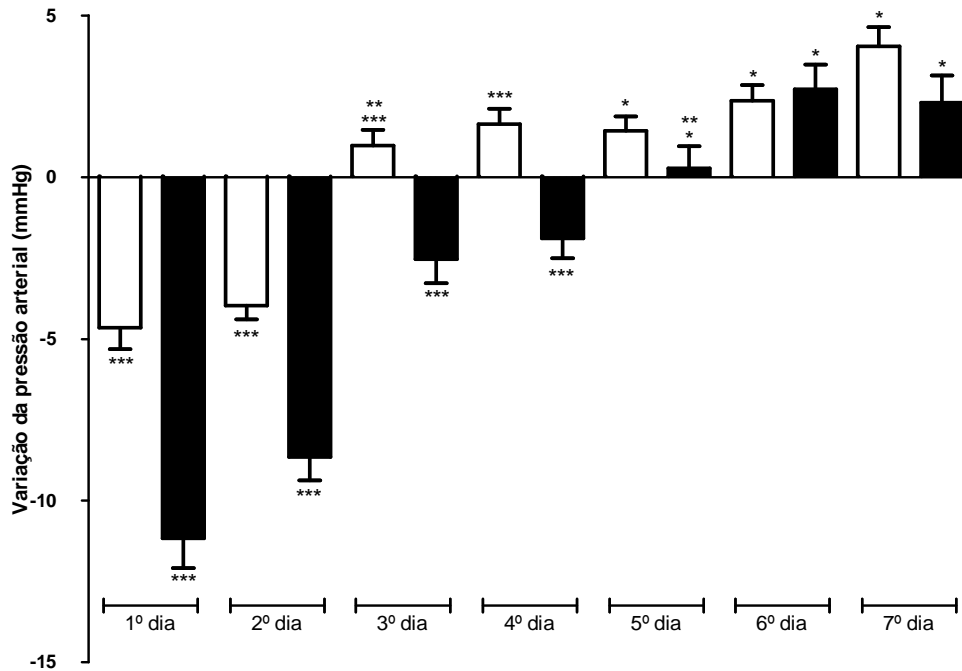


Figura 4.18. Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos após administração oral de uma dose de VAL (1,14 mg.kg<sup>-1</sup>) (barras brancas) e composto de inclusão LIOF (4,22 mg.kg<sup>-1</sup>) (barras pretas). \* não há diferença significativa entre VAL e LIOF, \*\* não há diferença significativa e p>0,05 na comparação com o período controle, \*\*\* p< 0,0001 comparando VAL e LIOF no mesmo dia (Student T Test não pareado).

Na Figura 4.19 (p.103) está apresentado o perfil da média da variação da PA dos ratos do grupo que recebeu VAL e do grupo que recebeu LIOF. Pela Figura pode-se verificar que no período das quarenta primeiras horas de tratamento há maior freqüência de pontos abaixo da linha de controle. A linha de controle indica a ausência de variação da PA. Também é possível verificar a variação da PA dos animais em função do ciclo circadiano dos mesmos e que o perfil de variação de LIOF encontra-se abaixo do perfil obtido para VAL indicando que a redução da PA foi mais freqüente para os animais que receberam o composto de inclusão.

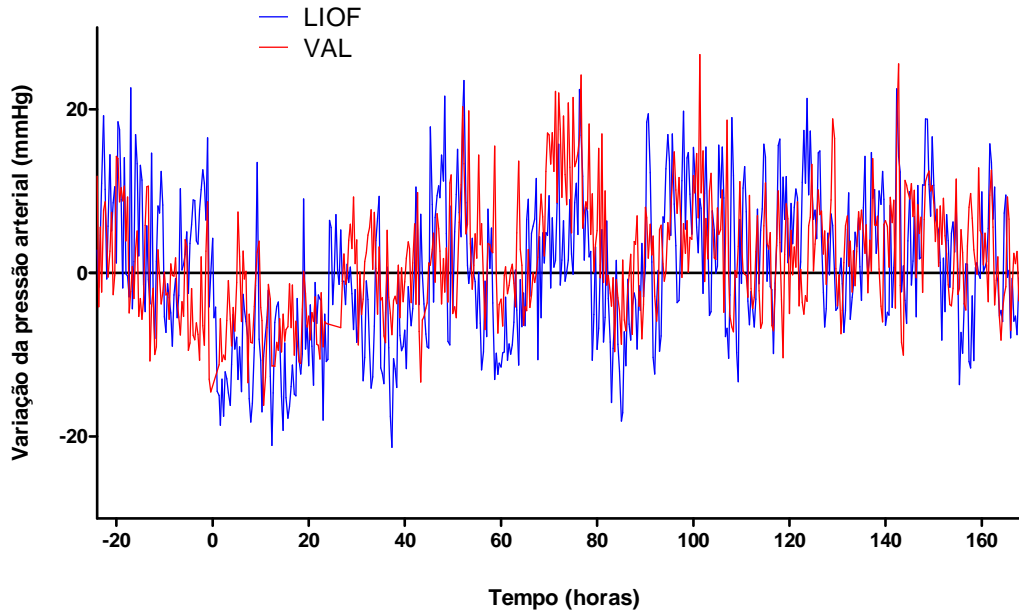


Figura 4.19. Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos após administração oral de uma dose de VAL ( $1,14 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (linha vermelha) e composto de inclusão LIOF ( $4,22 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (linha azul).

Os animais que receberam VAL e LIOF foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada (luz: 6:00 h às 18:00 h). A partir desta condição fez-se análise da pressão arterial média no período claro e escuro, sabendo que o ritmo circadiano é responsável por alterações de parâmetros fisiológicos como a pressão arterial e frequência cardíaca. Os resultados de variação da pressão arterial no ciclo claro e escuro estão apresentados na Figura 4.20 (p.104).

Os dados apresentados na Figura 4.20 (p.104) mostram que a ação de VAL é maior no ciclo claro do primeiro dia, reduzindo a PA em  $-7,48 \text{ mm Hg} \pm 1,00$ . Quando a quantidade do fármaco é maior no TGI tem-se maior absorção do fármaco, levando a uma maior efetividade de absorção no primeiro ciclo pós gavagem representado na Figura 4.20 (p.104). No ciclo claro do segundo dia esta redução da PA é menos intensa chegando a  $-4,85 \text{ mm Hg} \pm 0,55$ . Não há diferença significativa para o efeito de VAL nestes dois ciclos claros ( $p > 0,05$ ). Já a observação dos resultados referentes ao ciclo escuro permite verificar que a redução da PA só é significativa no primeiro dia, decaindo  $-5,47 \text{ mm Hg} \pm 0,54$ . No segundo dia do ciclo escuro ao qual o animal foi submetido já não há diferença significativa em relação ao período controle do estudo ( $p > 0,05$ ). Avaliando LIOF, verifica-se também que no ciclo claro a redução da PA só ocorre significativamente nos dois primeiros dias, diminuindo, respectivamente,  $-11,55 \text{ mm Hg} \pm 1,25$  e  $-2,36 \text{ mm Hg} \pm 0,97$ , no primeiro e segundo dia. A maior redução, assim como para VAL, ocorre no ciclo pós gavagem, onde a quantidade de fármaco é maior no TGI.

Considerando o período escuro após administração de LIOF tem-se que a diminuição da PA foi significativa nos quatro primeiros dias. A redução mais significativa ocorreu no primeiro dia e foi igual a  $-9,80 \text{ mm Hg} \pm 0,96$ . Nos dias subseqüentes ainda foi nítida a redução proporcionada pelo composto de inclusão, sendo as reduções da PA iguais a  $-5,97 \text{ mm Hg} \pm 1,25$  (2º dia),  $-3,30 \text{ mm Hg} \pm 0,92$  (3º dia) e  $-2,53 \text{ mm Hg} \pm 0,88$  (4º dia).

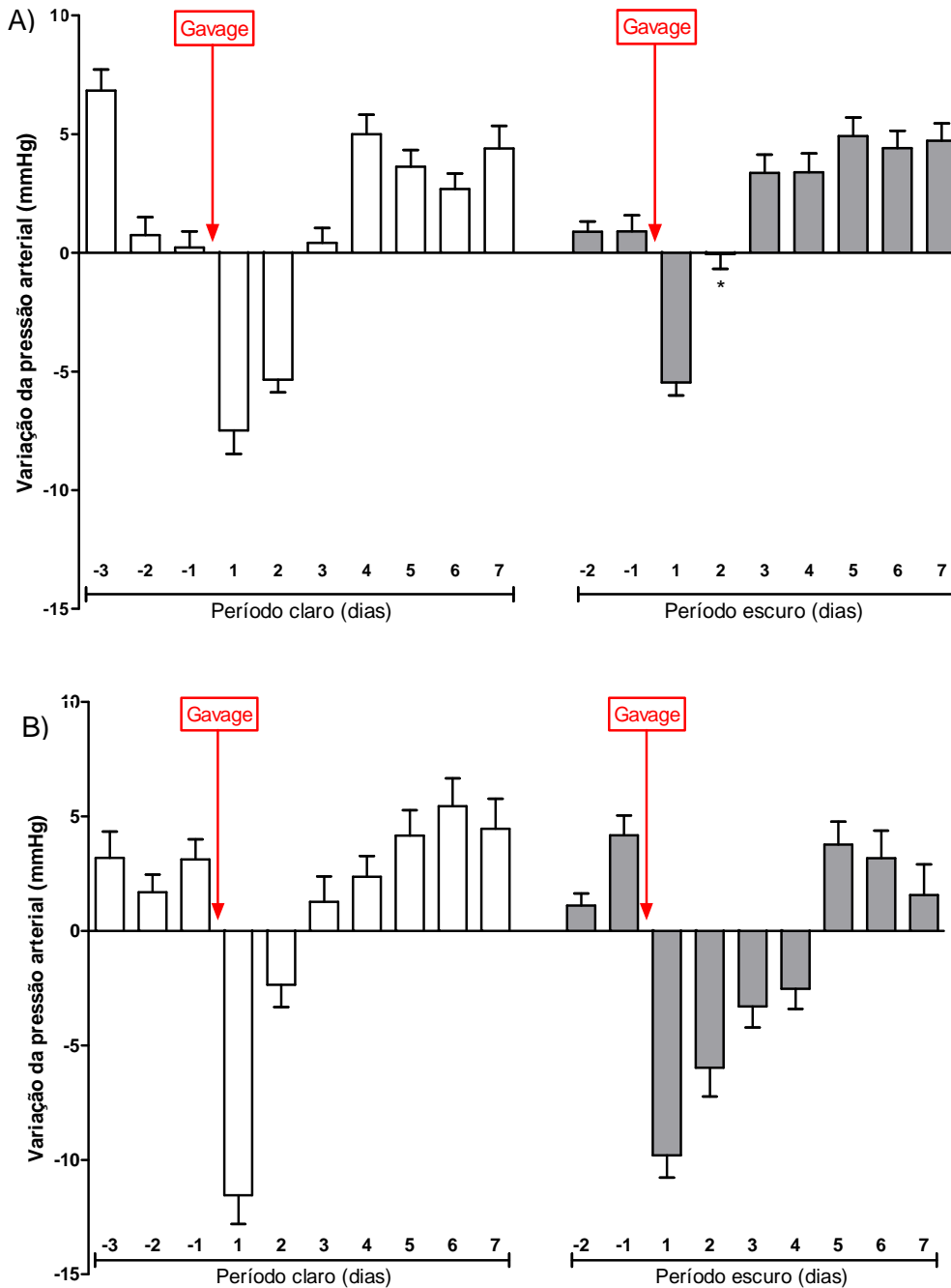


Figura 4.20. A) Variação da pressão arterial (PA) de ratos Wistar hipertensos, no período claro (barra branca) e escuro (barra cinza), após administração oral de A) uma dose de VAL ( $1,14 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e B) LIOF ( $4,22 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). \* não há diferença significativa em comparação com o período controle.

No período claro e escuro houve redução da pressão arterial dos animais. Essa redução foi mais acentuada no período escuro. Uma possível justificativa para isso está associada à maior pressão arterial (PA) nesse momento, já que os animais se encontravam em atividade. Durante o esforço físico há um aumento na produção de neurohormônios como adrenalina e noradrenalina e esses alteram tanto o débito cardíaco (DC) quanto à resistência periférica total (RPT). Sendo a pressão arterial uma grandeza diretamente proporcional às duas variáveis citadas anteriormente conclui-se que a mesma é elevada no período escuro dos animais (GUYTON & HALL, 2002).

Diante de todos os resultados biológicos obtidos e de posse das caracterizações físico-químicas realizadas, tem-se que as modificações ocorridas nas propriedades físico-químicas do valsartan, após sua inclusão em  $\beta$ -CD, foram capazes de proporcionar ganhos de solubilidade que promoveram maior absorção do fármaco, resultando em aumento da biodisponibilidade do valsartan. O valsartan é um fármaco da Classe Biofarmacêutica II que tem problemas de dissolução no TGI e com a utilização do complexo conseguiu-se aumento desta solubilidade o que fez com que o número de moléculas solúveis na luz intestinal crescesse. Conforme 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).

Após administração de LIOF observa-se que o mesmo tem capacidade de reduzir de maneira mais rápida e prolongada a pressão arterial em comparação a VAL. Este efeito mais rápido do complexo LIOF relaciona-se à sua maior solubilidade conforme evidenciado pelos estudos de dissolução intrínseca. Já o efeito duradouro está relacionado à formação do composto de inclusão que através da dissociação progressiva na luz do trato gastrointestinal, garante a liberação lenta e sustentada do valsartan complexado para absorção através do TGI.

Com a dissociação do composto no TGI, as ciclodextrinas são liberadas para metabolização ou formação de outros complexos mais estáveis do que aquele formado com o valsartan. Não há nestes casos absorção da molécula íntegra do ciclodextrina em função de sua elevada massa molar e grande hidrofília (UEKAMA et al., 1998). Sua metabolização é mais comum e ocorre na região do cólon sob ação de microorganismos que compõem a flora local (LOFTSSON et al., 1996).

O complexo entre VAL: $\beta$ -CD obtido por liofilização ofereceu então de maneira relativamente simples alternativa para elevação da biodisponibilidade do fármaco. 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 em tratamentos crônicos.



## 4.2. Sinvastatina e lovastatina

Para efeito de discussão será apresentada conjuntamente a caracterização dos complexos obtidos entre a  $\beta$ -CD e as estatinas lovastatina ou sinvastatina. As técnicas escolhidas para preparação dos mesmos foram dispersão sólida e pasta. Os complexos foram caracterizados termodinamicamente, por difração de raios-X, por espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho, análise térmica incluindo TG/DTG e DSC e ressonância magnética nuclear através da técnica bidimensional 2D-ROESY.

### 4.2.1. Solubilidade Termodinâmica

A caracterização termodinâmica dos complexos formados a partir da sinvastatina e lovastatina com  $\beta$ -CD permitiu observar que nas duas situações houve elevação da solubilidade do fármaco em água em função da concentração de  $\beta$ -CD no meio (Figuras 4.21, p.107), sugerindo formação do composto de inclusão. Esta elevação por si só já é relevante, pois os dois fármacos são pertencentes à Classe Biofarmacêutica II, representada por aqueles produtos ativos que tem sua biodisponibilidade limitada à dissolução no trato gastrointestinal (TSRL INC, 2010). A interpretação dos diagramas de solubilidade obtidos nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C e apresentados na Figura 4.21 (p.107) sugere que os mesmos seguem o perfil tipo  $A_L$  descrito por Higuchi & Connors (1965); e em acordo com Jun e colaboradores (2007), os quais descrevem a caracterização dos complexos de SVT e HP- $\beta$ -CD, mostrando que o perfil do diagrama de solubilidade termodinâmica segue o modelo  $A_L$ .

O ganho de solubilidade da sinvastatina (SVT) e lovastatina (LVT) em presença de  $\beta$ -CD foi calculado para todas as temperaturas de trabalho. Quando a concentração da  $\beta$ -CD chegou ao seu limite de saturação em água, na concentração de 0,0158 mol. L<sup>-1</sup>, o ganho real de solubilidade da sinvastatina foi de 29,5 vezes a temperatura de 25°C. Nas temperaturas de 30°C e 37°C a elevação da solubilidade foi, respectivamente, de 38,8 e 35,7 vezes. Já o resultado do aumento de solubilidade para a lovastatina foi proporcionalmente menor se comparado à sinvastatina, sendo igual a 5,6 vezes na temperatura de 25°C e 10,1 e 16,0 vezes para as temperaturas de 30°C e 37°C, respectivamente.

Na literatura, há vários estudos descritos considerando o ganho de solubilidade em água de estatinas como estratégia determinante para elevação da biodisponibilidade oral das mesmas. Para a lovastatina, estudos com diferentes ciclodextrinas se mostraram capazes de proporcionar este ganho de dissolução em água. Patel & Patel (2007a) prepararam complexos de LVT e  $\beta$ -CD e concluíram que o ganho de solubilidade foi de 10,75 vezes a 25°C. Já Süle & Csempesz (2008) relataram que este ganho varia de 5 vezes. Substituindo-se a ciclodextrina e empregando-se a HP- $\beta$ -CD, Patel & Patel (2007b) afirmam que o ganho de solubilidade é de 17,2 vezes em água. Quando a estatina empregada é a sinvastatina, Süle & Csempesz (2008) concluíram que o ganho de solubilidade é de 8

vezes se a ciclodextrina empregada é a  $\beta$ -CD, podendo chegar a 13,3 vezes no caso da HP- $\beta$ -CD segundo Patel & Patel (2007c)

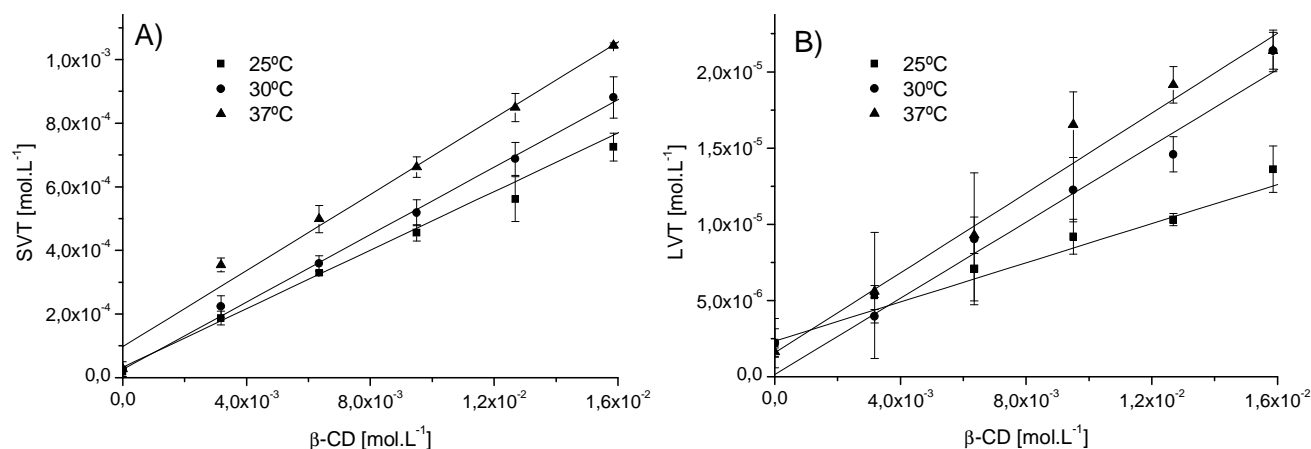


Figura 4.21: Diagrama de solubilidade da sinvastatina (A) e lovastatina (B) em presença de  $\beta$ -CD nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C. (O número de amostras foi igual a 3).

Baseando-se ainda nos diagramas de solubilidade termodinâmica, regressões lineares calculadas e na Equação 1, foram determinadas as constantes de formação  $K_c$  para o complexos (Tabela 4.7, p.108). A ordem da constante de formação  $K_c$  dos complexos é significativamente distinta para as estatinas estudadas, sendo de  $10^3$  para a sinvastatina enquanto para a lovastatina a ordem seria de  $10^2$ , ou seja, a estabilidade do complexo SVT: $\beta$ -CD é superior à estabilidade do complexo LVT: $\beta$ -CD. Assim sendo, conforme Mosher & Thompson (2007), no caso da administração oral de SVT: $\beta$ -CD, teríamos o efeito de diluição garantindo que cerca de 20% apenas de todo o complexo manter-se-ia na forma não dissociada. Para a lovastatina esta proporção é menor chegando apenas a 10% do total do complexo LVT: $\beta$ -CD administrado. Analisando-se os diferentes valores de  $K_c$  calculados para a formação dos complexos, verifica-se que no caso da SVT tem-se redução da constante de formação quando há elevação da temperatura. Isto não ocorre com a lovastatina que teve sua constante de formação elevada quando houve aumento da temperatura. Para efeito de comparação estão apresentadas na Tabela 4.8 (p.108) as constantes de formação de complexos de SVT e LVT descritos na literatura.

Analisando comparativamente os dados bibliográficos de complexos entre  $\beta$ -CD e VAL da Tabela 4.8 (p.108) com os resultados do presente trabalho verifica-se diferença na ordem dos resultados. A busca pelo método de determinação das constantes de formação mostrou que a técnica empregada foi a mesma deste trabalho, variando-se apenas a duração do estudo. Uma razão para justificar a diferença observada seria a possível hidrólise da lactona da SVT, a qual pode gerar um composto mais solúvel em água interferindo dessa forma na determinação da constante de formação do composto de inclusão SVT: $\beta$ -CD.

Tabela 4.7: Parâmetros para a regressão linear do diagrama de solubilidade de fase da sinvastatina (SVT) e lovastatina (LVT) em presença de  $\beta$ -CD.

	Temperatura	Equação linear	R	Constante de formação ( $K_c$ )
SVT	25°C	$y = 0,0460x + 0,00003$	0,9970	$2552,1 \text{ M}^{-1} \pm 4,51$
	30°C	$y = 0,0534x + 0,00002$	0,9992	$2563,7 \text{ M}^{-1} \pm 6,45$
	37°C	$y = 0,0598x + 0,00010$	0,9960	$2340,2 \text{ M}^{-1} \pm 3,87$
LVT	25°C	$y = 0,00064x + 0,00000230$	0,9911	$289,0 \text{ M}^{-1} \pm 8,32$
	30°C	$y = 0,01250x + 0,00000015$	0,9905	$565,8 \text{ M}^{-1} \pm 5,21$
	37°C	$y = 0,01320x + 0,00000180$	0,9872	$809,4 \text{ M}^{-1} \pm 7,65$

Média  $\pm$  s, número de amostras foi igual a 3; s = desvio padrão

Através da interpretação das curvas do diagrama solubilidade de fase pode-se afirmar que em função da inclinação da curvas o complexo foi formado na proporção molar de 1:1. Significa dizer então que há apenas uma molécula da  $\beta$ -CD interagindo e formando ligações fracas com a respectiva molécula do fármaco (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; ROSS et al., 1996; CHARUMANEE et al., 2006)

Tabela 4.8. Constantes de formação de complexos de LVT e SVT com ciclodextrinas descritas.

Fármaco	Ciclodextrina	Constante ( $K_c$ )	Referência
LVT	HP- $\beta$ -CD	$917,7 \text{ M}^{-1}$ (37°C)	PATEL & PATEL (2007b)
	$\beta$ -CD	$190,0 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	SÜLE & CSEMPEZ (2008)
	$\beta$ -CD	$190,0 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	CSEMPEZ et al. (2010)
	$\beta$ -CD	$538,8 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	PATEL & PATEL (2007a)
	$\beta$ -CD	$2166,0 \text{ M}^{-1}$ -	MEHRAMIZI et al. (2007)
SVT	HP- $\beta$ -CD	$727,7 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	SHIRALASHETT et al. (2010)
	HP- $\beta$ -CD	$774,0 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	JUN et al. (2007)
	HP- $\beta$ -CD	$804,4 \text{ M}^{-1}$ (37°C)	PATEL & PATEL (2007c)
	HP- $\beta$ -CD	$846,0 \text{ M}^{-1}$ (37°C)	JUN et al. (2007)
	HP- $\beta$ -CD	$924,0 \text{ M}^{-1}$ (45°C)	JUN et al. (2007)
	$\beta$ -CD	$210,0 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	SÜLE & CSEMPEZ (2008)
	$\beta$ -CD	$210,0 \text{ M}^{-1}$ (25°C)	CSEMPEZ et al. (2010)
	$\beta$ -CD	$410,2 \text{ M}^{-1}$ (37°C)	SHIRALASHETT et al. (2010)
$\beta$ -CD	$520,5 \text{ M}^{-1}$ (37°C)	PATEL & PATEL (2007c)	

Para melhor compreensão termodinâmica, calculou-se a entalpia das reações de complexação, entropia e energia livre de Gibbs, com base nas constantes de formação dos

complexos de inclusão em diferentes temperaturas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). A variação de entalpia do processo de formação do complexo de inclusão pode ser determinada a partir da Equação de van't Hoff (Equação 3). Esta Equação considera que a interação hóspede:hospedeiro é um processo em equilíbrio dinâmico onde a variação da entalpia é considerada como uma constante nas temperaturas estudadas. Por outro lado, considerando que o equilíbrio foi alcançado em solução, a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) pode ser determinada pela Equação 2 e a variação da entropia pela Equação 4 (LOFTSSON & BREWSTER, 1996). Todos os resultados para a sinvastatina e lovastatina estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Média\* dos parâmetros termodinâmicos para os complexos SVT: $\beta$ -CD e LVT: $\beta$ -CD preparados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.

SVT: $\beta$ -CD	$\Delta H$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	-5,02 ( $\pm$ 1,45 <sup>a</sup> )
	$\Delta S$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	0,05 ( $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> )
	$\Delta G$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	-19,74 ( $\pm$ 0,28 <sup>a</sup> )
LVT: $\beta$ -CD	$\Delta H$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	68,93 ( $\pm$ 3,59 <sup>a</sup> )
	$\Delta S$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	0,28 ( $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> )
	$\Delta G$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )	-15,76 ( $\pm$ 1,62 <sup>a</sup> )

\*O número de amostras foi igual a 3; ; a = valor referente ao desvio padrão

Conforme todos os parâmetros termodinâmicos calculados, verifica-se que a complexação entre  $\beta$ -CD e sinvastatina é um processo exotérmico e favorável ( $\Delta H = - 5,02 \pm 1,45$  KJ.mol<sup>-1</sup>) ao passo que a complexação da lovastatina é um fenômeno endotérmico ( $\Delta H = 68,93 \pm 3,59$  KJ.mol<sup>-1</sup>). Jun et al. (2007) referem-se à complexação da sinvastatina com HP- $\beta$ -CD como um processo endotérmico com  $\Delta H = 6,94 \pm 0,12$  KJ.mol<sup>-1</sup>, ou seja, um processo desfavorável entalpicamente. LOFTSSON (1998) destaca que nos casos onde há uma variação de entalpia negativa, como no caso da SVT, o processo de formação do composto de inclusão é caracterizado pelo estabelecimento de interações de van der Waals e ligações de hidrogênio entre o fármaco e a ciclodextrina. Essas interações são denominadas interações hidrofóbicas e são dirigidas entalpicamente

No que concerne à entropia do meio, tanto a complexação da lovastatina quanto da sinvastatina com  $\beta$ -ciclodextrina tiveram elevação da entropia. Para o complexo LVT: $\beta$ -CD a variação  $\Delta S$  foi igual a  $0,28 \pm 0,10$  J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> e para o complexo SVT: $\beta$ -CD  $\Delta S$  calculado foi de  $0,05 \pm 0,02$  J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. Dessa forma o processo de inclusão da lovastatina em  $\beta$ -CD é mais favorável entropicamente. A energia livre de Gibbs teve resultado negativo indicando que para os dois complexos preparados os mesmos são formados espontaneamente. De posse de todos os parâmetros pode-se afirmar que a complexo SVT: $\beta$ -CD forma-se mais espontaneamente e que o complexo LVT: $\beta$ -CD também se forma de maneira espontânea mas é dependente da elevação da temperatura.

## 4.2.2. Difractometria de raios-X

Os perfis de difração de raios-X de pó para SVT e LVT,  $\beta$ -CD e compostos de inclusão preparados pelo método de dispersão sólida e pasta são apresentados na Figura 4.22. A sinvastatina e a lovastatina possuem perfil de difração característico de um produto cristalino como apresentado anteriormente. Já a  $\beta$ -CD mostra-se como um produto policristalino, com picos máximos em  $19,0^\circ 2\theta$ ,  $12,7^\circ 2\theta$  e  $23,0^\circ 2\theta$ , respectivamente.

A análise do difratograma de raios-X dos compostos de inclusão preparados para a SVT (Figura 4.22) permite verificar que dependendo da técnica empregada têm-se características distintas para os produtos. Quando o complexo é preparado pela técnica de dispersão sólida há maior amorfização do pó tornando-o semicristalino. Foi possível identificar picos máximos em  $9,4^\circ 2\theta$  e  $18,8^\circ 2\theta$  referentes à SVT. Mas em função do perfil obtido, pode-se afirmar que há maior grau de desorganização com menor repetição de subunidades da SVT em DIS, sugerindo a formação de nova espécie química com características estruturais distintas da SVT e da  $\beta$ -CD. A menor cristalinidade de DIS é interessante, pois nesta condição teríamos um produto com mais rápida velocidade de dissolução. Já análise do perfil de difração da Pasta permite constatar que o grau de cristalinidade é elevado e similar ao da MF, indicando que a complexação não foi efetiva. Foi possível identificar pico máximo relacionado à SVT em  $17,4^\circ 2\theta$  e  $\beta$ -CD em  $12,6^\circ 2\theta$ , sugestivos de cristalinidade do sólido. Através do resultado pode-se inferir que não houve a formação do complexo entre a  $\beta$ -CD e SVT, pois caso os compostos de inclusão fossem formados haveria amorfização do pó (HANCOCK, 2007).

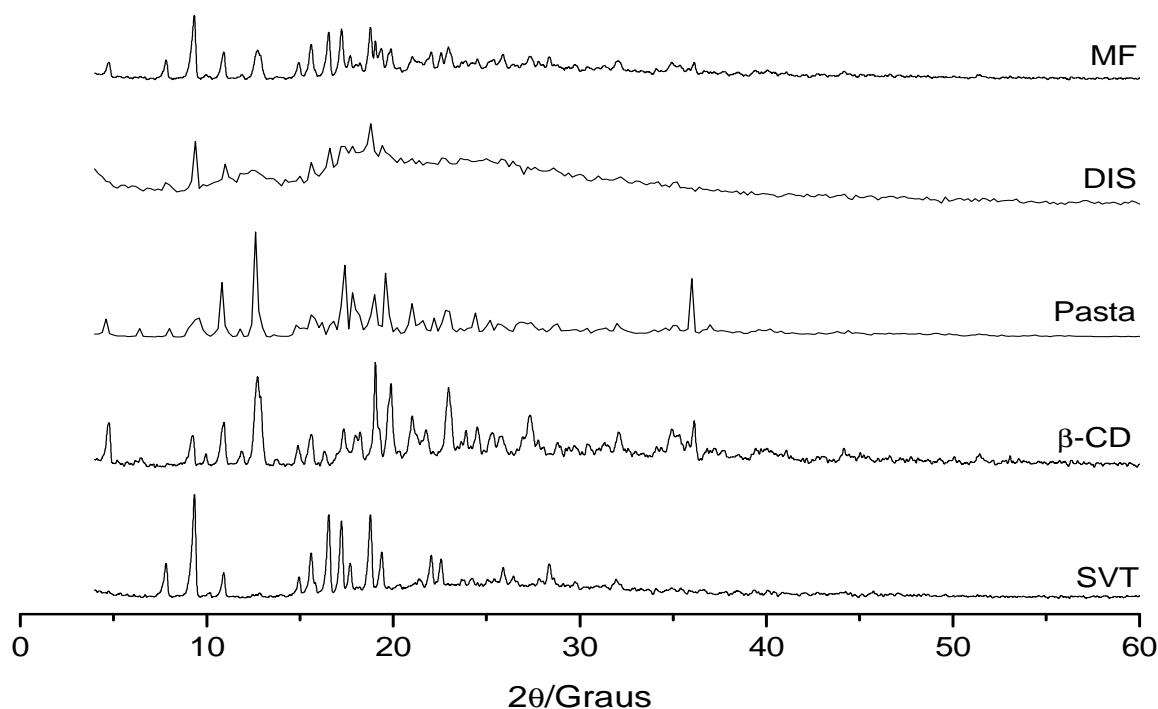


Figura 4.22. Difractograma de raios-X de pó para a sinvastatina (SVT),  $\beta$ -CD, mistura física (MF) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e Pasta.

A condição semicristalina de DIS contendo SVT poderia ser justificada em função da técnica de liofilização selecionada para secagem, capaz por si só de induzir amorfização de sólidos (HANCOCK, 2007). GRAESER e colaboradores (2008) tentaram preparar SVT amorfa pelo processo de liofilização, mas perceberam que a estabilidade deste pó era muito reduzida, observando-se cristalização em prazo inferior a vinte e quatro horas. Para DIS não foi identificada evolução da cristalinidade em função do tempo, pois no prazo de três anos o perfil de difração de raios-X de pó manteve-se inalterado.

A análise para a lovastatina segue caminho semelhante ao da sinvastatina, pois avaliando o difratograma de raios-X de pó (Figura 4.23) pode-se verificar a diferença de cristalinidade para a DIS e a Pasta. Para DIS pode-se verificar menor cristalinidade em função do perfil de difração, embora ainda sejam identificados picos máximos em  $16,8^\circ 2\theta$  e  $9,4^\circ 2\theta$  para LVT e  $19,0^\circ 2\theta$  para a  $\beta$ -CD. A cristalinidade da  $\beta$ -CD foi significativamente alterada, pois o pico máximo encontrada para a matéria-prima em  $12,7^\circ 2\theta$  não foi identificado na dispersão sólida. Já para a pasta, onde a quantidade de solvente é menor durante a produção do composto de inclusão, a solubilização das espécies foi menos expressiva, dificultando a inserção da LVT na cavidade da  $\beta$ -CD e mantendo a cristalinidade elevada no produto final. A comparação do difratograma da Pasta com o da LVT e  $\beta$ -CD permite identificar vários picos semelhantes que podem ser considerados como indicadores de cristalinidade, assim como na MF onde não há complexação. Destacam-se os sinais da lovastatina em  $9,6^\circ 2\theta$  e  $17,0^\circ 2\theta$  e para a  $\beta$ -CD o pico característico pode ser observado em  $12,8^\circ 2\theta$  e  $19,0^\circ 2\theta$ .

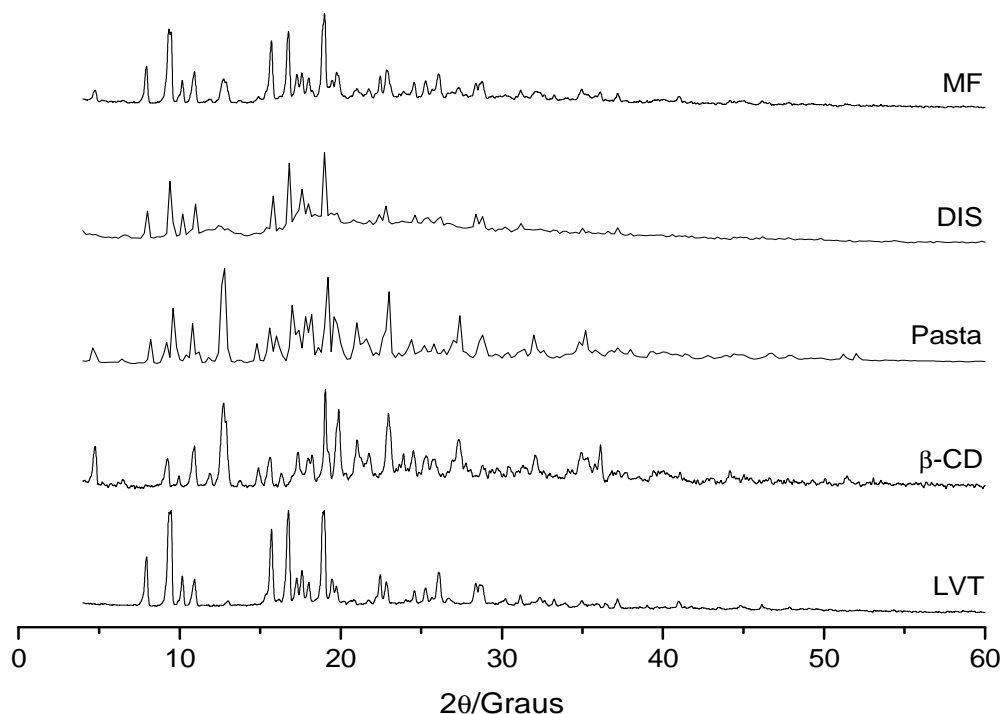


Figura 4.23. Difratograma de raios-X de pó para a lovastatina (LVT),  $\beta$ -CD, mistura física (MF) e complexos obtidos por dispersão sólida (DIS) e Pasta.

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

A caracterização dos complexos obtidos entre as estatinas e a  $\beta$ -CD foi conduzido por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, considerando conforme Lamcharfi e colaboradores (1995) que a supressão, deslocamento, diminuição ou qualquer outra alteração no espectro é indício de algum fenômeno que pode ser atribuído à complexação com a ciclodextrina.

Os espectros de Absorção na Região do Infravermelho para a sinvastatina e lovastatina juntamente com os complexos preparados pelas técnicas de pasta e dispersão sólida estão apresentados na Figura 4.24 e 4.25 (p.113).

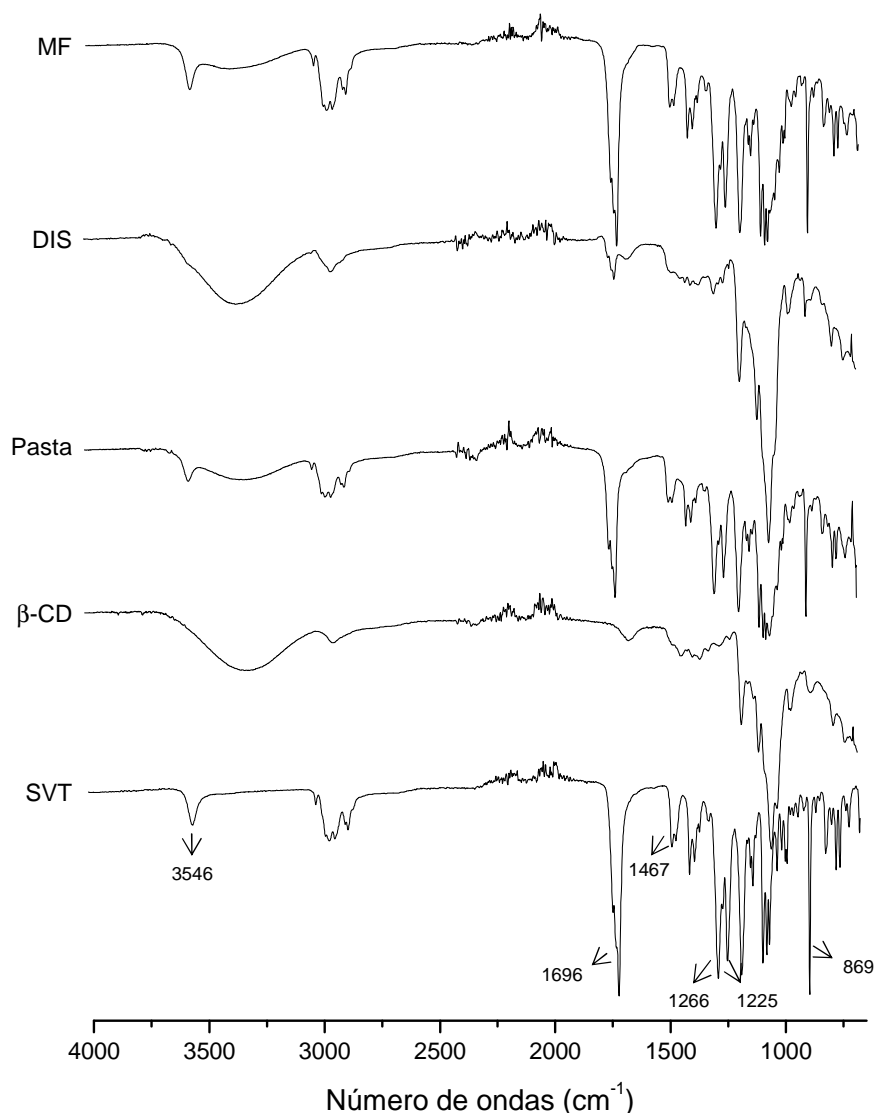


Figura 4.24. Comparação dos espectros de Absorção na Região do Infravermelho para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), sinvastatina (SVT), complexos SVT/ $\beta$ -CD obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -CD (MF).

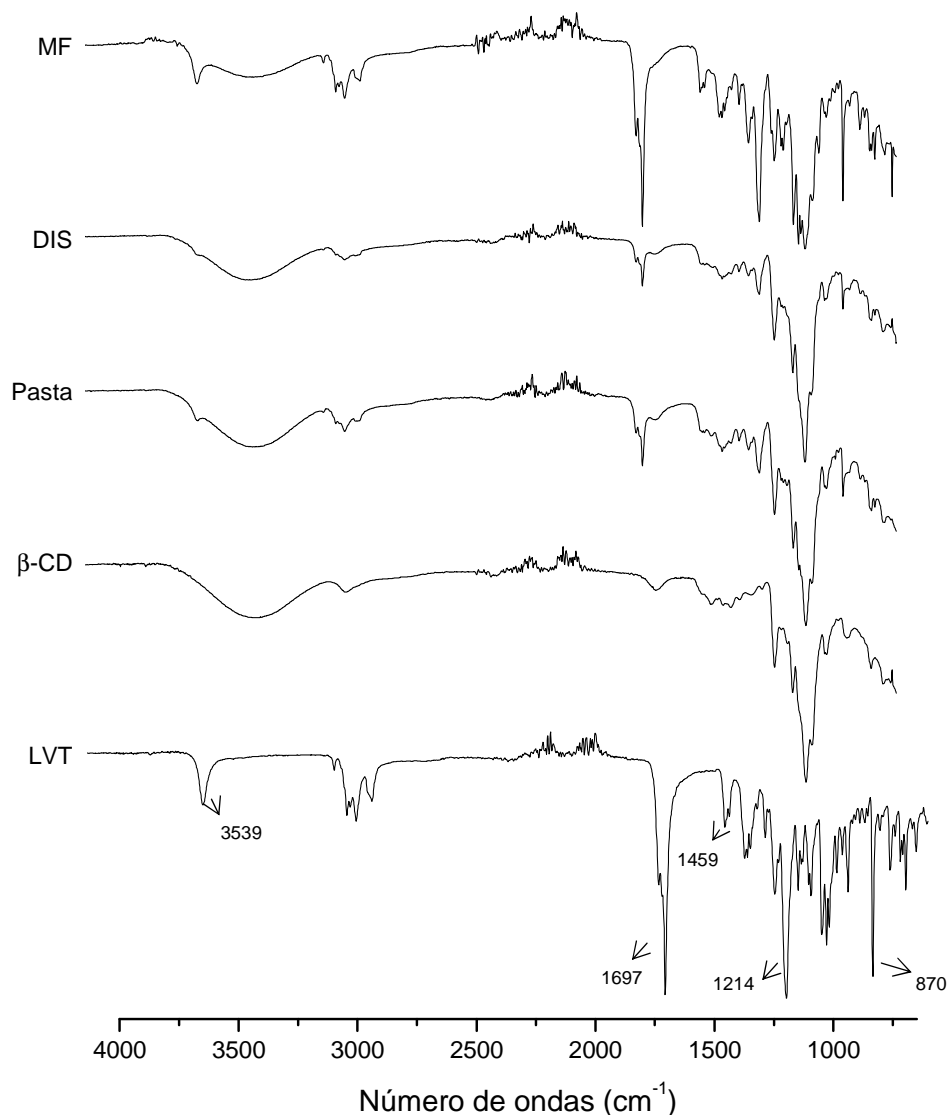


Figura 4.25. Comparação dos espectros de Absorção na Região do Infravermelho para  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), lovastatina (LVT), complexos LVT/ $\beta$ -CD obtidos pela técnica de dispersão sólida (DIS) e pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -CD (MF).

Através da interpretação dos espectros, tanto para sinvastatina quanto para lovastatina, verifica-se diminuição da intensidade e supressão de sinais. A supressão destes sinais não pode ser atribuída simplesmente ao efeito de diluição pela  $\beta$ -CD, já que na mistura física (MF), preparada nas mesmas proporções molares dos complexos, nota-se a presença dos mesmos modos vibracionais apenas menos intensos.

Analisando o espectro da sinvastatina verifica-se alteração do sinal em  $3546\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{O-H})}$  de álcool da ligação de hidrogênio intermolecular),  $1722\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{C=O})}$  de éster - C1'),  $1696\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{C=O})}$  de éster da lactona - C6'),  $1467\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{C=C})}$ ),  $1266\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{(\text{C-O-C})}$  da lactona),  $1225\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{(\text{C-O-C})}$  de éster) e finalmente  $869\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{(\text{C-H})}$  de alceno trissubstituído  $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2$ ). Para a lovastatina observam-se



alterações semelhantes aos da sinvastatina como em  $3539\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{O-H})}$  de álcool da ligação de hidrogênio intermolecular),  $1697\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{C=O})}$  de éster do anel - C6'' e  $\nu_{(\text{C=O})}$  de éster - C1),  $1459\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{(\text{C=C})}$ ),  $1214\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{(\text{C-O-C})}$  de éster) e finalmente  $870\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{(\text{C-H})}$  de alceno trissubstituído  $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2$ ). Todos os resultados obtidos sugerem que a  $\beta$ -CD possivelmente interagiu com a sinvastatina e lovastatina em três pontos distintos conforme a Figura 4.26 (p.115).

Um sinal interessante para avaliação da amorfização e possível formação dos compostos de inclusão pode ser observado no espectro de infravermelho na região de  $3546\text{ cm}^{-1}$  para a SVT e em  $3539\text{ cm}^{-1}$  para a LVT. Ambos os sinais estão relacionados ao grau de cristalinidade da matéria-prima, indicando a presença de ligação de hidrogênio intermolecular do fármaco (CEJKA et al., 2003). A supressão ou minimização deste sinal seria então a evidência da amorfização do pó e até mesmo da inclusão da estatina na cavidade da  $\beta$ -CD. Verificando MF e os perfis para os compostos de inclusão à base de SVT, tem-se que na MF e na Pasta este sinal é nítido, mas em DIS ele não é verificado. Estes dados estão de acordo como os resultados encontrados por difração de raios-X que também indicou que a amorfização foi mais significativa para a dispersão sólida e que na Pasta a cristalinidade ainda se mostrava expressiva.

Já a análise da LVT e seus complexos indicam semelhantemente que na dispersão sólida a cristalinidade foi menor em função da reduzida intensidade da banda em  $3539\text{ cm}^{-1}$ . Embora este sinal ainda seja visível é menos significativa do que na Pasta. A intensidade do sinal na MF foi tomada como referência já que neste produto não há inclusão do fármaco na cavidade da  $\beta$ -CD. Da mesma forma os dados obtidos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho estão em acordo com os resultados de difração de raios-X.

Embora conforme a complexação tenha se procedido nas mesmas regiões tanto para a sinvastatina quanto para a lovastatina, em função da análise dos espectros de infravermelho pode-se inferir então que a complexação foi mais significativa para o método da dispersão sólida nos dois casos. Os espectros da dispersão sólida apresentaram mais intensa redução nos sinais referentes à deformação das carbonilas. Se avaliado apenas os complexos de lovastatina, DIS e Pasta mostraram-se semelhantes no que concerne à complexação, destacando apenas que a porção de material não complexado pelo método da Pasta é maior. Se analisarmos da mesma forma os complexos com sinvastatina, pode-se inferir também que o método de dispersão sólida mostrou-se melhor em relação à Pasta. O espectro da Pasta por apresentar nitidamente os sinais referentes à SVT não pode ser considerada como efetiva para proporcionar inclusão do fármaco, ou seja, a maior porcentagem do fármaco está na forma livre capaz de ser identificado pelo método espectroscópico usado.

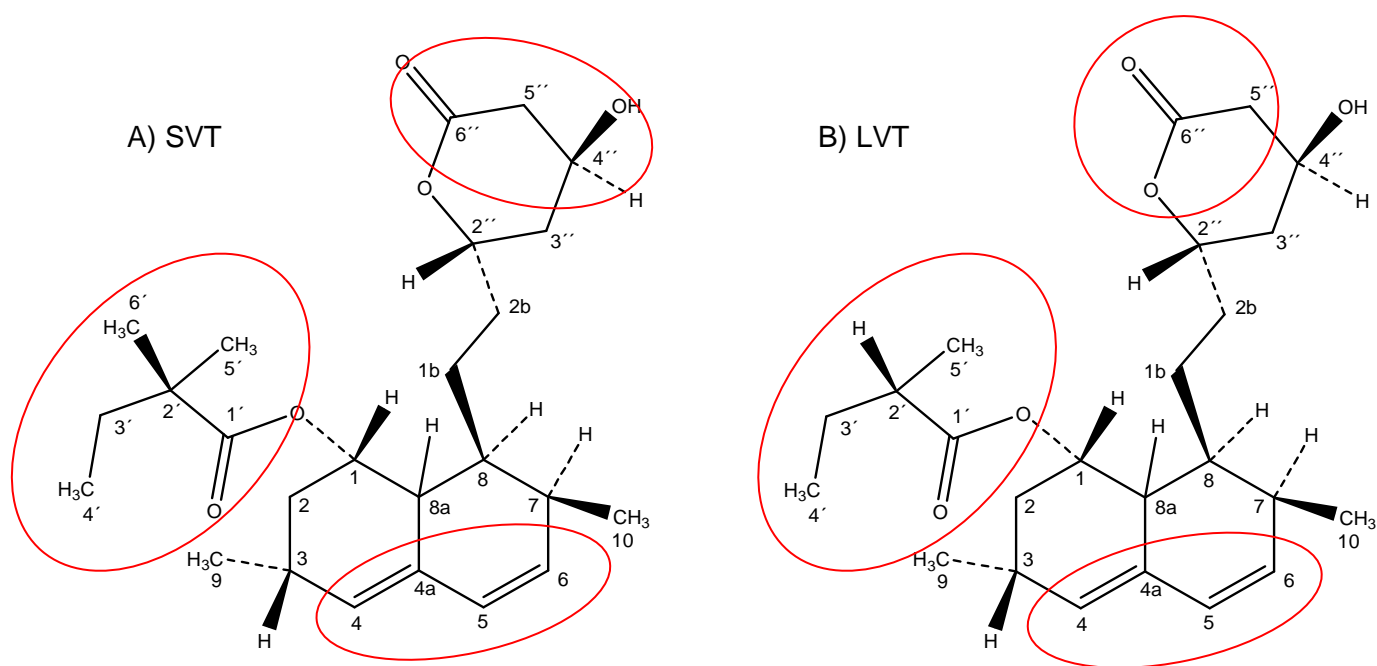


Figura 4.26. Sítios de interação da  $\beta$ -CD com a simvastatina (SVT) e lovastatina (LVT) conforme resultados obtidos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

Jun e colaboradores (2007) também prepararam complexo de simvastatina, mas com HP- $\beta$ -CD e os caracterizou por FTIR. O processo escolhido envolveu a dispersão dos pós na proporção molar de 1:1 em solvente diclorometano: etanol (1:2), sob pressão de 118 atm a 40°C como condição para viabilizar a complexação. O complexo obtido foi seco pelo insuflamento de gás carbônico que garantiu o arraste de todo o solvente empregado. Na caracterização por infravermelho realizada por Jun e colaboradores (2007) pode-se destacar que houve a supressão e redução de intensidade dos mesmos sinais como observado com a técnica de dispersão sólida utilizada neste trabalho. Como vantagem temos que as condições de produção da dispersão sólida são menos drásticas e envolvem apenas a geração de vapor d'água e etanol como subprodutos a serem descartados.

#### 4.2.4. Análise térmica

As curvas TG e DTG para a SVT,  $\beta$ -CD, compostos de inclusão e mistura física estão representadas na Figura 4.27 (p.116) e 4.28 (p.118). A análise da curva TG para a  $\beta$ -CD apresenta uma perda de massa de 12,5% na faixa de 30° a 95°C referente à perda de oito moléculas de água presentes na cavidade da  $\beta$ -CD. Após este primeiro evento verifica-se um patamar de estabilidade térmica até 350°C aproximadamente. O próximo fenômeno acontece com perda total de massa indicando completa decomposição da matéria-prima em temperatura próxima a 700°C.

Nos estudos térmicos dos complexos obtidos pelas técnicas de pasta e dispersão sólida, além da mistura física preparada entre a  $\beta$ -CD e a simvastatina, não houve em nenhum dos casos geração

de resíduo sólido ao final da análise, indicando completa decomposição dos constituintes orgânicos (Figura 4.27).

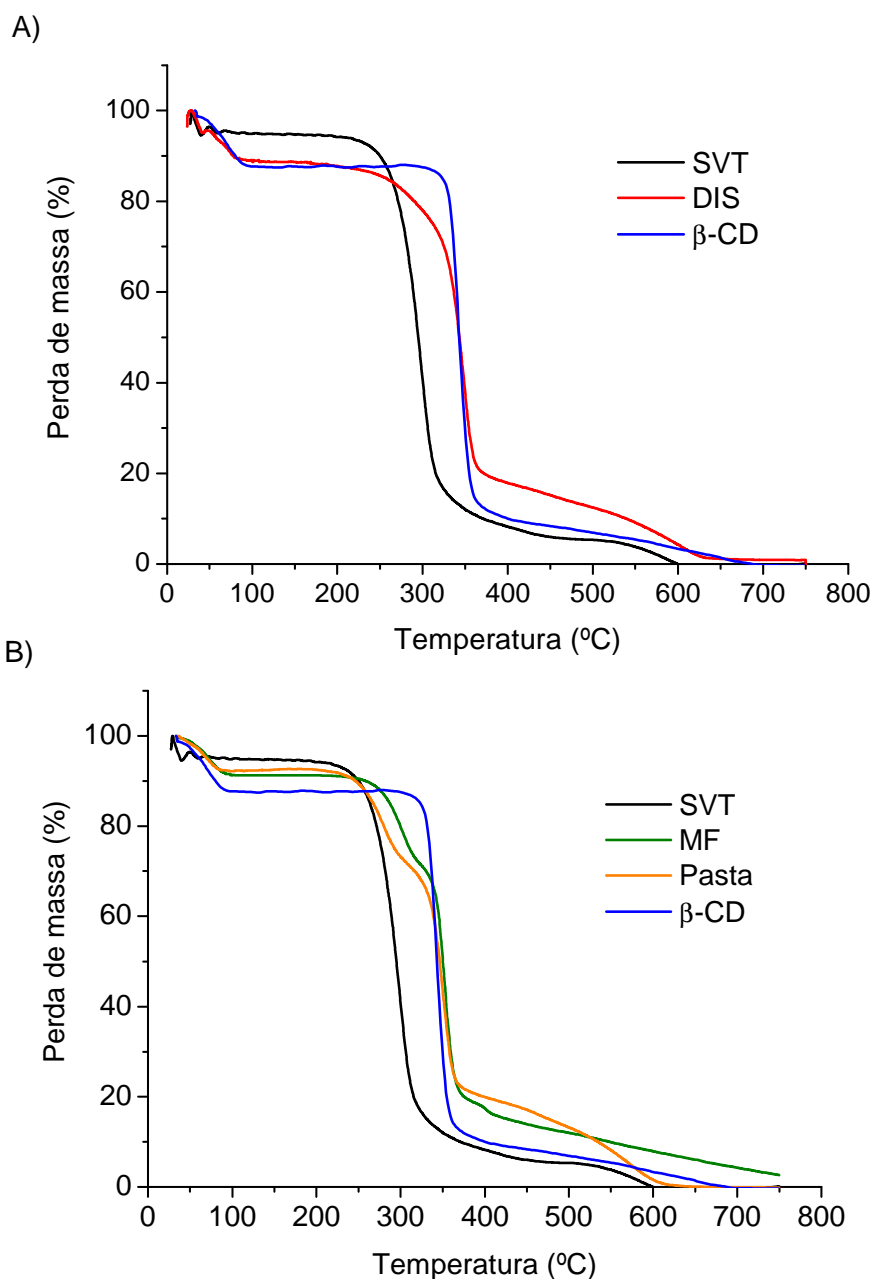


Figura 4.27. Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF).

Os fenômenos de perda de massa ocorridos com todas as amostras foram sumariados na Tabela 4.10 (p.117).

Tabela 4.10. Eventos observados nas curvas TG obtidas para a sinvastatina,  $\beta$ -CD, complexos SVT/ $\beta$ -CD e mistura física.

Amostras*	1º evento		2º evento		3º evento		4º evento	
	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda
$\beta$ -CD	30 - 95	12,5	95 - 700	87,5	-	-	-	-
SVT	31 - 462	93,1	462 - 632	6,9	-	-	-	-
DIS	35 - 176	5,3	176 - 408	77,4	408 - 744	17,4	-	-
Pasta	37 - 96	7,8	96 - 311	21,2	311 - 411	52,0	411 - 627	19,2
MF	37 - 222	8,3	222 - 325	19,7	325 - 749	68,4	-	-

\*Legenda:  $\beta$ -CD:  $\beta$ -ciclodextrina, SVT: sinvastatina, DIS: complexo obtido por dispersão sólida, Pasta: complexo obtido pela técnica da pasta, MF: mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina.

A sinvastatina é um fármaco que se oxida com facilidade à temperatura ambiente requerendo muitas vezes a refrigeração durante armazenamento. Este evento de oxidação poderia ser percebido na TG ou mais facilmente ainda na DSC. Como a análise é conduzida em atmosfera de nitrogênio, a oxidação não se tornou nítida, observando-se apenas a decomposição do fármaco. As análises dos perfis de TG da sinvastatina,  $\beta$ -CD e os complexos SVT/ $\beta$ -CD preparados indicaram aumento da estabilidade térmica dos complexos em relação ao fármaco livre. Nos casos onde houve associação entre  $\beta$ -CD e SVT há um primeiro evento relacionado à perda de água das amostras. Na Pasta esta porcentagem é de 7,8%, na DIS 5,3% e na MF 8,3%.

A porcentagem de perda de água na MF foi de 8,3%p/p e na  $\beta$ -CD 12,5%p/p. A menor perda de água na MF pode ser relacionada à diluição da  $\beta$ -CD pela SVT que é um pó que não apresenta umidade. A redução em pontos percentuais na perda de água é compatível matematicamente com a diluição da  $\beta$ -CD pela SVT. Pode-se considerar então que toda esta água refere-se às moléculas provenientes da cavidade interna da  $\beta$ -CD. Já a umidade relacionada à preparação dos complexos pode ser facilmente observada na Pasta onde a temperatura utilizada para secagem é de 40°C, insuficiente para remoção completa da umidade do pó. Já no caso da DIS a remoção dos solventes acontece por liofilização, uma técnica capaz de remover toda a água adsorvida, mas não incluída na cavidade interna da  $\beta$ -CD. Assim sendo, como houve perda de massa associada à umidade nos complexos, acredita-se pelos resultados de TG, que não houve inclusão de toda a sinvastatina, que esta inclusão foi parcial e maior em DIS do que na Pasta.

Um menor número de eventos está presente na DIS indicando maior grau de associação entre a SVT e  $\beta$ -CD e mesmo a formação de nova espécie supramolecular. Outro indício de menor grau de interação entre a SVT e  $\beta$ -CD na Pasta vem da comparação com a MF, pois nos dois casos os segundos eventos de perda de massa são semelhantes, terminado próximo a 320°C e correspondendo, respectivamente, a 21,2% e 19,7%. Com a avaliação das curvas TG verifica-se então que no caso da Pasta houve sobreposição das curvas referentes à TG da SVT e  $\beta$ -CD.

Através das curvas DTG mostradas na Figura 4.28 constata-se da mesma forma o aumento de estabilidade térmica dos complexos em relação à SVT. Esta estabilidade pode ser caracterizada pela elevação da temperatura onde ocorre a velocidade máxima da perda mais significativa de massa. No caso da SVT esta temperatura é de 297°C. Na DIS esta temperatura sobe para 348°C. Já na Pasta e MF são observadas maiores semelhanças com a DTG da SVT, com manutenção do evento de decomposição nas temperaturas de 281° para a pasta e 302°C para MF.

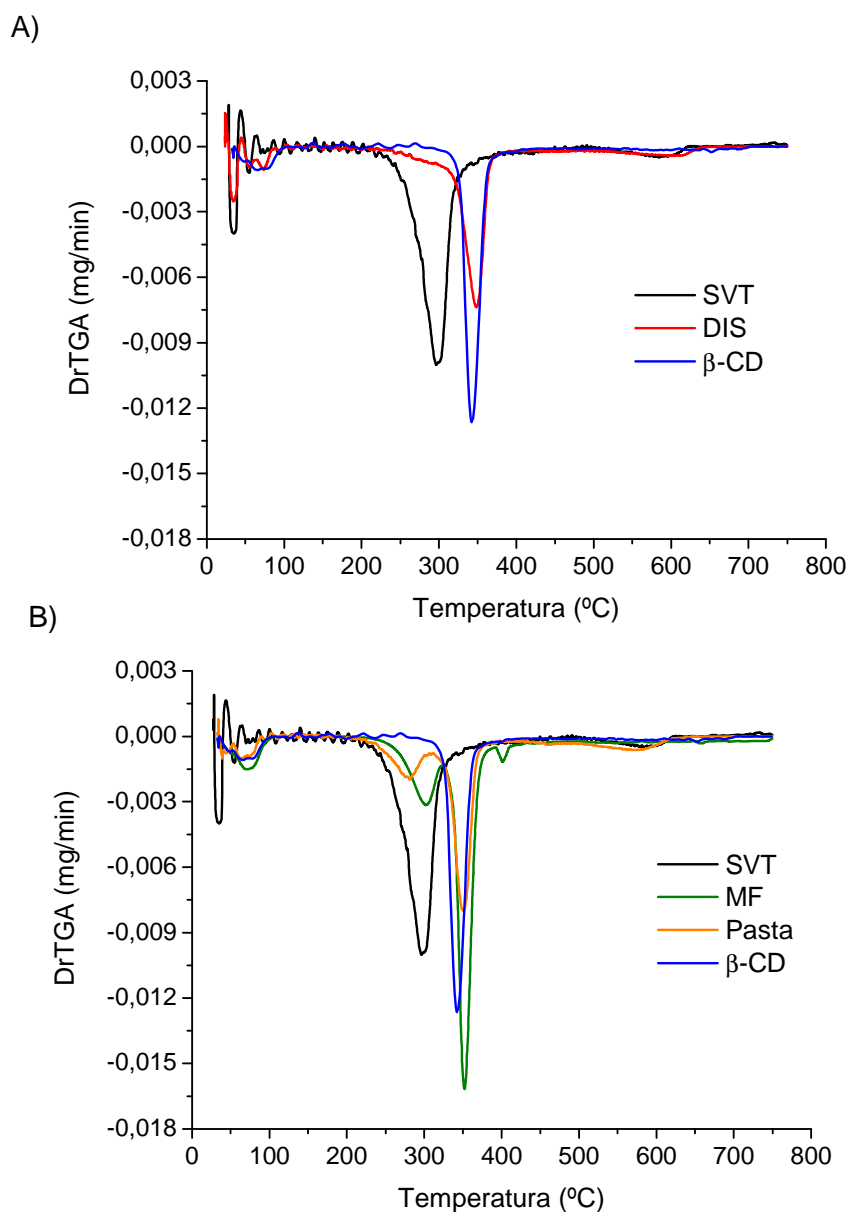


Figura 4.28. Curvas DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT) e complexos SVT/ $\beta$ -CD preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF).

De forma geral, para a DIS há um único grande evento de perda de massa em 348°C enquanto que para a Pasta e MF há dois grandes eventos de perda de massa. No caso da Pasta

estes acontecem em 281° e 350°C e no caso da MF em 302° e 352°C. Os eventos ocorreram em temperaturas semelhantes sugerindo que há sobreposição de curvas e semelhança da Pasta com a MF. Mais uma vez a análise térmica aponta indícios que o maior grau de interação ocorreu para DIS em relação à Pasta.

Outra técnica empregada para caracterização dos complexos foi análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). O perfil das curvas de DSC para as amostras está representado na Figura 4.29.

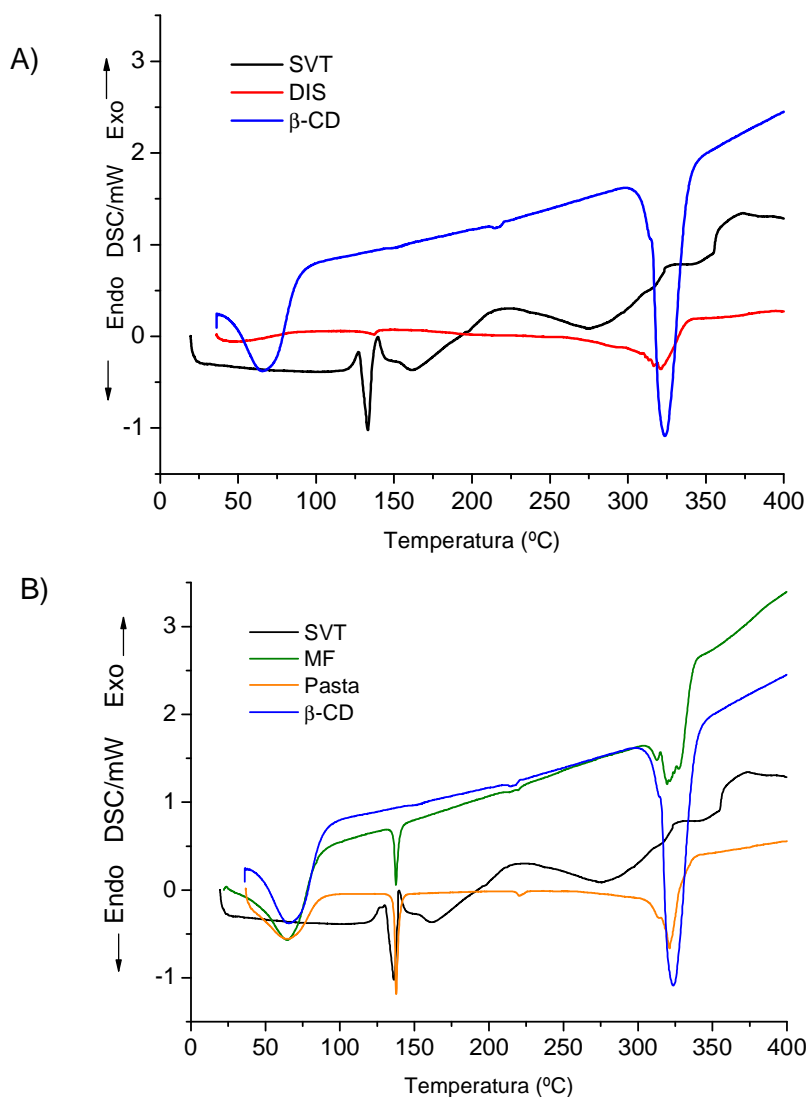


Figura 4.29. Curvas DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> para A) β-CD, sinvastatina (SVT) e complexo SVT/β-CD preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B) β-CD, sinvastatina (SVT), pasta (Pasta), e mistura física entre sinvastatina e β-ciclodextrina (MF).

Pelos perfis encontrados pode-se verificar na curva DSC da sinvastatina a fusão do fármaco em 133,18°C. Este pico endotérmico é um excelente indicativo do grau de interação e/ou complexação do fármaco com a β-CD, ou seja, a observação da fusão do fármaco e a intensidade do

sinal contribuem para monitoramento do processo de formação do composto de inclusão. Em todos os casos o pico endotérmico de fusão foi observado sugerindo presença de cristais de SVT que se fundiram em temperaturas próximos a 136°C. Para a Pasta a fusão do fármaco aconteceu em 137,7°C, para a DIS em 136,3°C e para a MF 136,9°C. A menor intensidade do pico de fusão foi observada para a DIS sugerindo maior grau de interação entre a simvastatina e  $\beta$ -CD.

As curvas TG e DTG para a lovastatina,  $\beta$ -CD compostos de inclusão e mistura física estão representadas na Figura 4.30 e 4.31 (p.123). Nos estudos térmicos dos complexos obtidos pelas técnicas de pasta e dispersão sólida, além da mistura física preparada entre a  $\beta$ -CD e a lovastatina, não houve em nenhum dos casos geração de resíduo sólido ao final da análise, indicando completa decomposição.

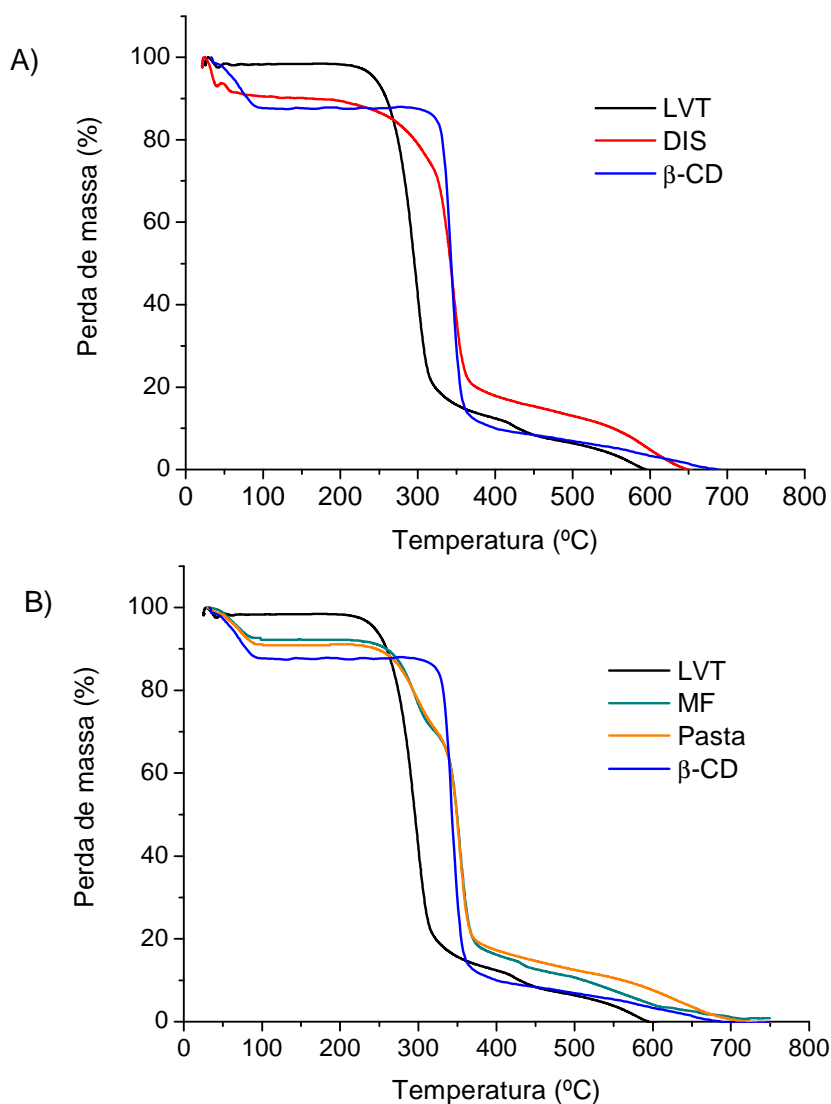


Figura 4.30. Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexo LVT/ $\beta$ -CD preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF).

Os fenômenos de perda de massa ocorridos com todas as amostras foram sumariados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Eventos observados nas curvas TG obtidas para a lovastatina,  $\beta$ -CD, complexos LVT/ $\beta$ -CD e mistura física.

Amostras*	1º evento		2º evento		3º evento		4º evento	
	Temp.°C	% perda	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda	Temp. °C	% perda
$\beta$ -CD	30 - 95	12,5	95 - 700	87,5	-	-	-	-
LVT	31 - 457	91,8	457 - 608	8,2	-	-	-	-
DIS	30 - 72	4,0	72 - 444	79,4	444 - 738	16,7	-	-
Pasta	37 - 104	6,3	104 - 316	28,0	316 - 406	45,8	406 - 661	20,1
MF	36 - 186	7,5	222 - 323	22,1	323 - 745	68,5	-	-

\*Legenda:  $\beta$ -CD :  $\beta$ -ciclodextrina, LVT: lovastatina, DIS: complexo obtido por dispersão sólida, Pasta: complexo obtido pela técnica da pasta, MF: mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina.

A lovastatina, assim como a sinvastatina, é um fármaco que se oxida com facilidade à temperatura ambiente requerendo condições especiais de armazenamento. Este evento de oxidação poderia ser percebido na TG ou mais facilmente ainda na DSC. Como as análises são conduzidas em atmosfera de nitrogênio, a oxidação não se tornou nítida, observando-se apenas a decomposição do fármaco em função da temperatura. As análises dos perfis de TG da lovastatina,  $\beta$ -CD e os complexos preparados indicaram aumento da estabilidade térmica dos complexos em relação ao composto livre. O mesmo foi observado para a sinvastatina. Nos casos onde houve associação entre  $\beta$ -CD e LVT há um primeiro evento relacionado à perda de água das amostras. Na Pasta esta porcentagem é de 6,3%, na DIS 4,0% e na MF 7,5%.

Considerando que na MF não há complexação e que a  $\beta$ -CD está apenas diluída com LVT, a porcentagem de água no pó, referente às moléculas presentes na cavidade interna da  $\beta$ -CD, cairia teoricamente de 12,5%p/p para 9,2%p/p. Havendo perda de umidade nos complexos pode-se atribuir e considerar que estas moléculas de água são provenientes da cavidade interna da  $\beta$ -CD, ou seja, havendo sinal de remoção das mesmas teríamos indícios que não ocorrera complexação do fármaco com a ciclodextrina. Esta umidade também pode ser proveniente do solvente empregado na preparação, mas não da LVT, pois na sua curva TG não indica de perda de massa próximo a 100°C relativo à umidade na amostra. A umidade relacionada à preparação dos complexos seria facilmente observada na Pasta onde a temperatura utilizada para secagem foi de 40°C, insuficiente para secagem completa do pó. Assim sendo, como houve perda de massa associada à umidade nos complexos, acredita-se pelos resultados de TG, que não houve inclusão de toda a lovastatina, que esta inclusão foi parcial e maior na DIS do que na Pasta.



Um menor número de eventos está presente na DIS, ou seja, neste produto há uma nova espécie supramolecular distinta da LVT e da  $\beta$ -CD, possivelmente o complexo de inclusão LVT: $\beta$ -CD. O desaparecimento de eventos característicos da LVT e da  $\beta$ -CD indicam maior grau de associação entre ambos. O segundo evento ocorrido com a DIS entre 72° - 444°C, correspondendo a perda de massa de 79,4%, também ocorre na Pasta, mas em dois estágios distintos. Um destes estágios acontece no intervalo de 104° - 316°C (perda de 28,0% de massa) e outro entre 316° - 406°C (perda de 45,8% de massa). A soma do segundo e terceiro eventos ocorridos com a Pasta poderiam então ser associados simplesmente ao segundo evento da DIS, com perda de massa equivalente a 73,8% para os dois eventos na Pasta e 79,4% na DIS. Outro indício de menor grau de interação entre a LVT e  $\beta$ -CD na Pasta vem da comparação com a MF, pois nos dois casos os segundos eventos de perda de massa são semelhantes, terminado próximo a 320°C e correspondendo, respectivamente, a 28,0% e 22,1%.

Através das curvas DTG mostradas na Figura 4.31 (p.123) verifica-se da mesma forma o aumento de estabilidade térmica dos complexos em relação à LVT. Esta estabilidade pode ser caracterizada pela elevação da temperatura onde a velocidade é máxima para o evento de maior perda de massa dos complexos. No caso da LVT esta temperatura é de 297°C. Na DIS esta temperatura sobe para 345°C. Já na Pasta e MF são observadas maiores semelhanças com a DTG da LVT, com manutenção do evento de decomposição nas temperaturas de 295° para a pasta e 295°C para MF. De forma geral, para a DIS há um único grande evento de perda de massa em 345°C enquanto que para a Pasta e MF há dois grandes eventos de perda de massa. Nestes dois últimos produtos há coincidência nas temperaturas de velocidade máxima de ocorrência dos eventos, sendo a temperatura do primeiro evento igual a 295°C e o segundo em 353°C. A partir das curvas TG e DTG é possível verificar que a DIS tem perfil mais semelhante à  $\beta$ -CD e maior estabilidade térmica sugerindo maior grau de interação entre o fármaco e a ciclodextrina.

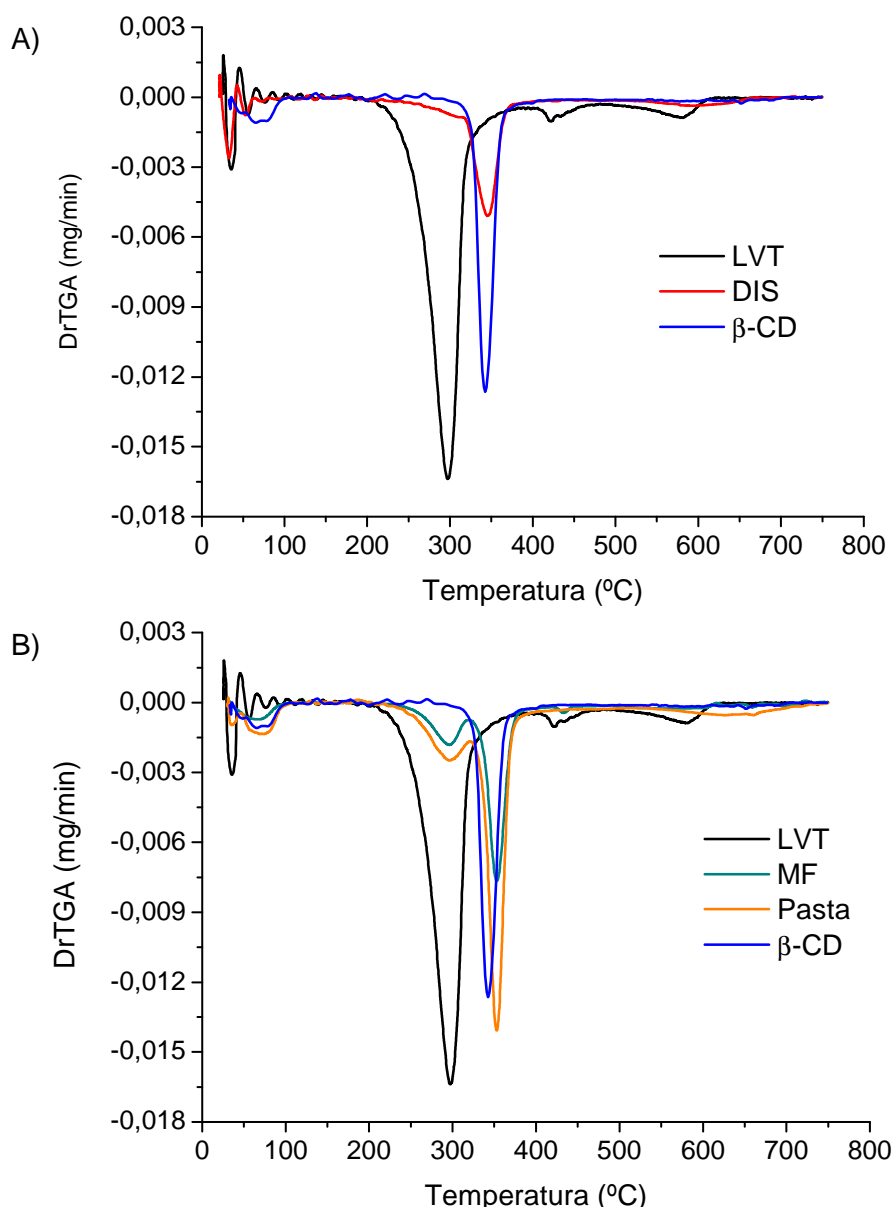


Figura 4.31. Curvas DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF).

A caracterização dos complexos por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) permitiu obter os perfis apresentados na Figura 4.32 (p.124). Analisando a curva DSC da LVT pode-se verificar a fusão do fármaco em  $171,2^\circ\text{C}$ . Este pico endotérmico é indicativo do grau de interação e/ou complexação do fármaco com a  $\beta$ -CD, ou seja, a observação da fusão do fármaco e a intensidade do sinal podem orientar quanto ao grau de interação entre as moléculas. Em todas as situações o pico endotérmico de fusão foi observado. Para a Pasta a fusão do fármaco aconteceu em  $169,2^\circ\text{C}$ , para a DIS em  $171,2^\circ\text{C}$  e para a MF  $171,4^\circ\text{C}$ .

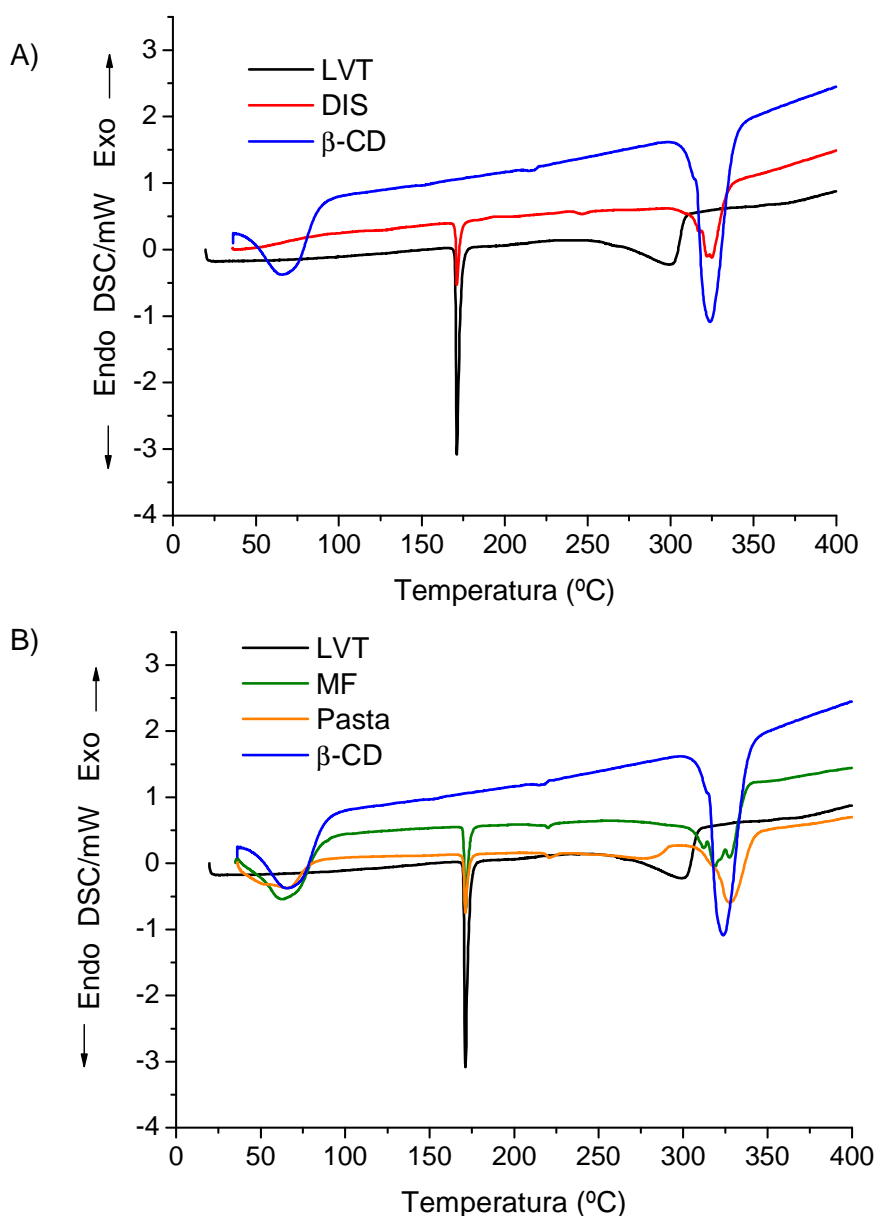


Figura 4.32. Curvas DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de  $N_2$ , vazão de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para A)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT) e complexos preparado pela técnica de dispersão sólida (DIS) e B)  $\beta$ -CD, lovastatina (LVT), pasta (Pasta), e mistura física entre lovastatina e  $\beta$ -ciclodextrina (MF).

#### 4.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Foi empregada a técnica de 2D-ROESY para caracterização dos complexos de sinvastatina e lovastatina. O solvente utilizado foi  $\text{DMSO}-d_6$  e a frequência de 400 MHz. As Figuras 4.33 (p.125) e 4.34 (p.126) apresentam os mapas de contornos para os complexos de sinvastatina e as Figuras 4.35 (p.127) e 4.36 (p.128) aos mapas de contornos para os complexos de lovastatina.

A partir dos resultados pode-se observar que não há interação entre a sinvastatina e os hidrogênios da cavidade interna (H3 e H5) da  $\beta$ -CD para os complexos sugeridos. No entanto,

quando a técnica de preparação dos complexos foi a de pasta, o mapa de contornos 2D-ROESY mostrou correlação do hidrogênio H4 da sinvastatina com o hidrogênio da hidroxila OH3 presente na borda da  $\beta$ -CD. Já pela técnica de dispersão sólida o grau de interação intermolecular foi visto que mais ligações de hidrogênio foram formadas em função do maior número de correlações encontradas no mapa de contornos 2D-ROESY (Figura 4.33). Verifica-se que o hidrogênio da hidroxila OH6 tem correlação espacial com um ou mais dos seguintes hidrogênios da sinvastatina: H2 $\beta$ , H3, H7, H8, H8a, H11, H12, H3" e H5".

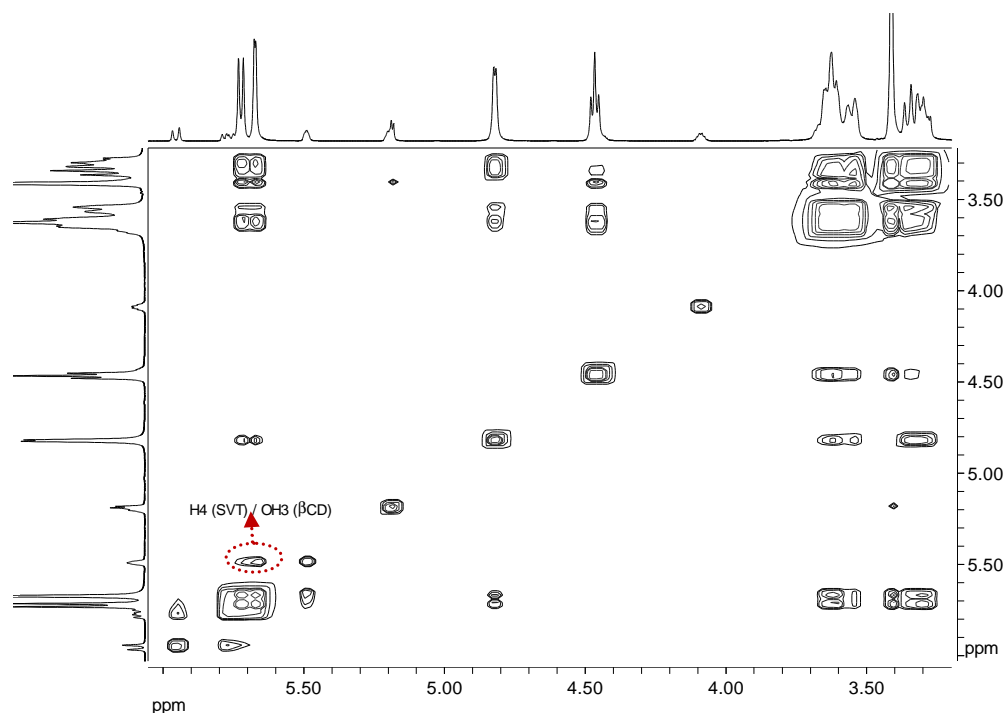


Figura 4.33. Ampliação de parte do mapa de contornos 2D-ROESY obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da sinvastatina preparado pela técnica de pasta, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.

Com relação à efetividade da complexação avaliada por ressonância magnética nuclear não se pode afirmar que as metodologias de pasta ou dispersão sólida permitiram a formação de complexos. Embora a granulometria do produto ativo seja pequena, muito desta baixa efetividade de interação está relacionada à reduzida solubilidade da sinvastatina em água, o que dificulta a migração molecular para a cavidade interna da  $\beta$ -CD. Outra consideração pode ser feita considerando que durante solubilização do complexo formado, no solvente de análise que foi dimetilsulfóxido, houve deslocamento do fármaco da cavidade da ciclodextrina com inserção do solvente. Relatos da literatura destacam que a complexação de fármacos muito pouco solúveis apresentam restrições, sendo necessário empregar alguma metodologia capaz de proporcionar desagregação molecular para permitir inclusão da substância na cavidade da ciclodextrina (MARTIN DEL VALLE, 2004).

Os mapas de contornos 2D-ROESY para complexos de lovastatina obtidos para a pasta (Figuras 4.34, p.126) e para a dispersão sólida (Figuras 4.35, p.127) estão mostrados a seguir. A

partir dos resultados pode-se verificar similaridade com os resultados para a sinvastatina e observar que não há inserção da molécula na cavidade interna da  $\beta$ -CD; se empregada a técnica bidimensional 2D-ROESY para caracterização dos produtos. Quando o método da pasta foi usado houve estabelecimento de ligações de hidrogênio entre a hidroxila OH2 da  $\beta$ -CD com hidrogênios da lovastatina, que por se sobreporem impediram a determinação exata de qual especificamente participou do evento. Os hidrogênios seriam o H3, H7, H8a, H2' e/ou H5''a.

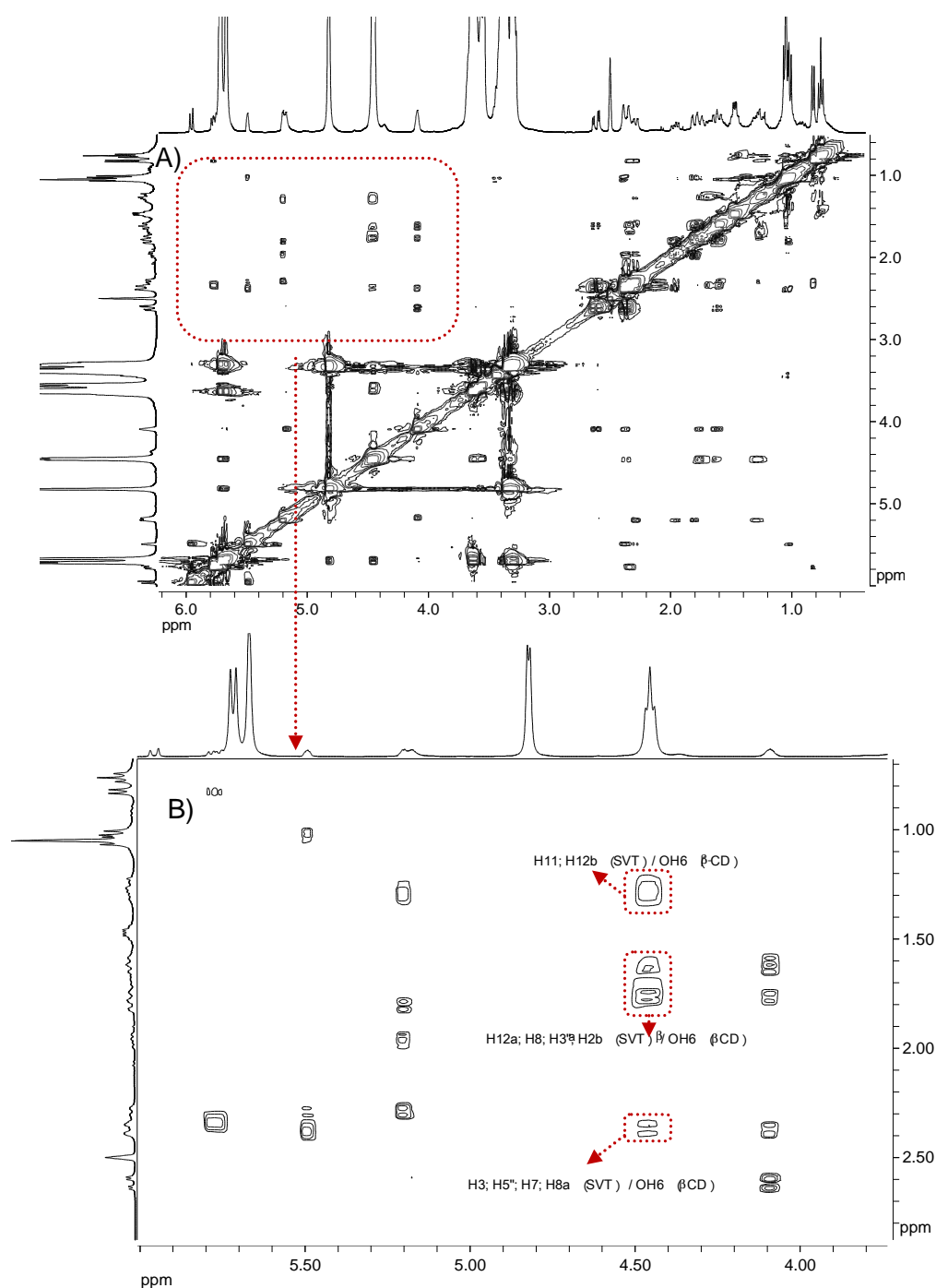


Figura 4.34. Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em  $\text{DMSO-}d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da sinvastatina preparado pela técnica de dispersão sólida, na temperatura de  $27^\circ\text{C}$  com tempo de mistura igual a 500mseg.

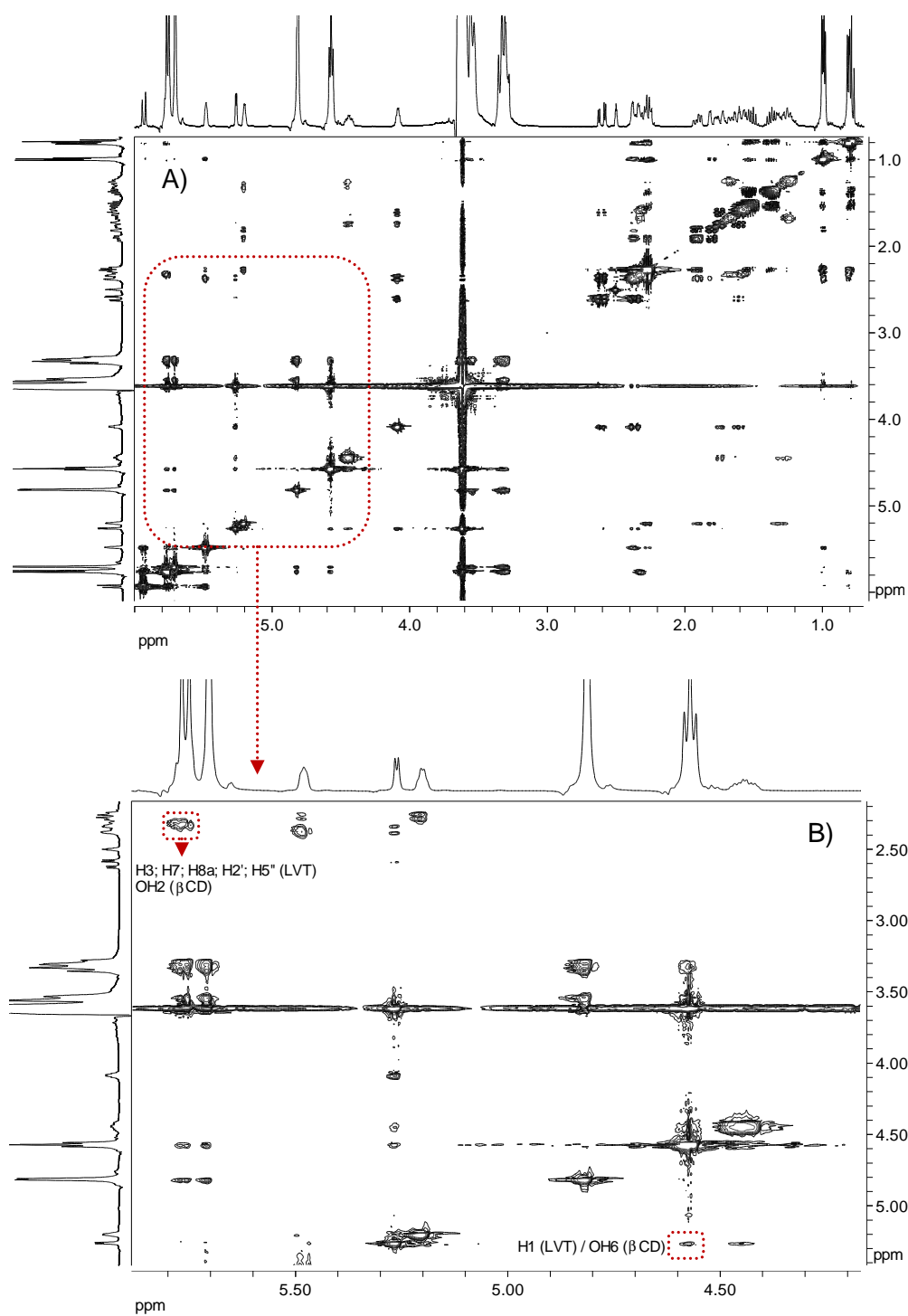


Figura 4.35: Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da lovastatina preparado pela técnica de pasta, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.

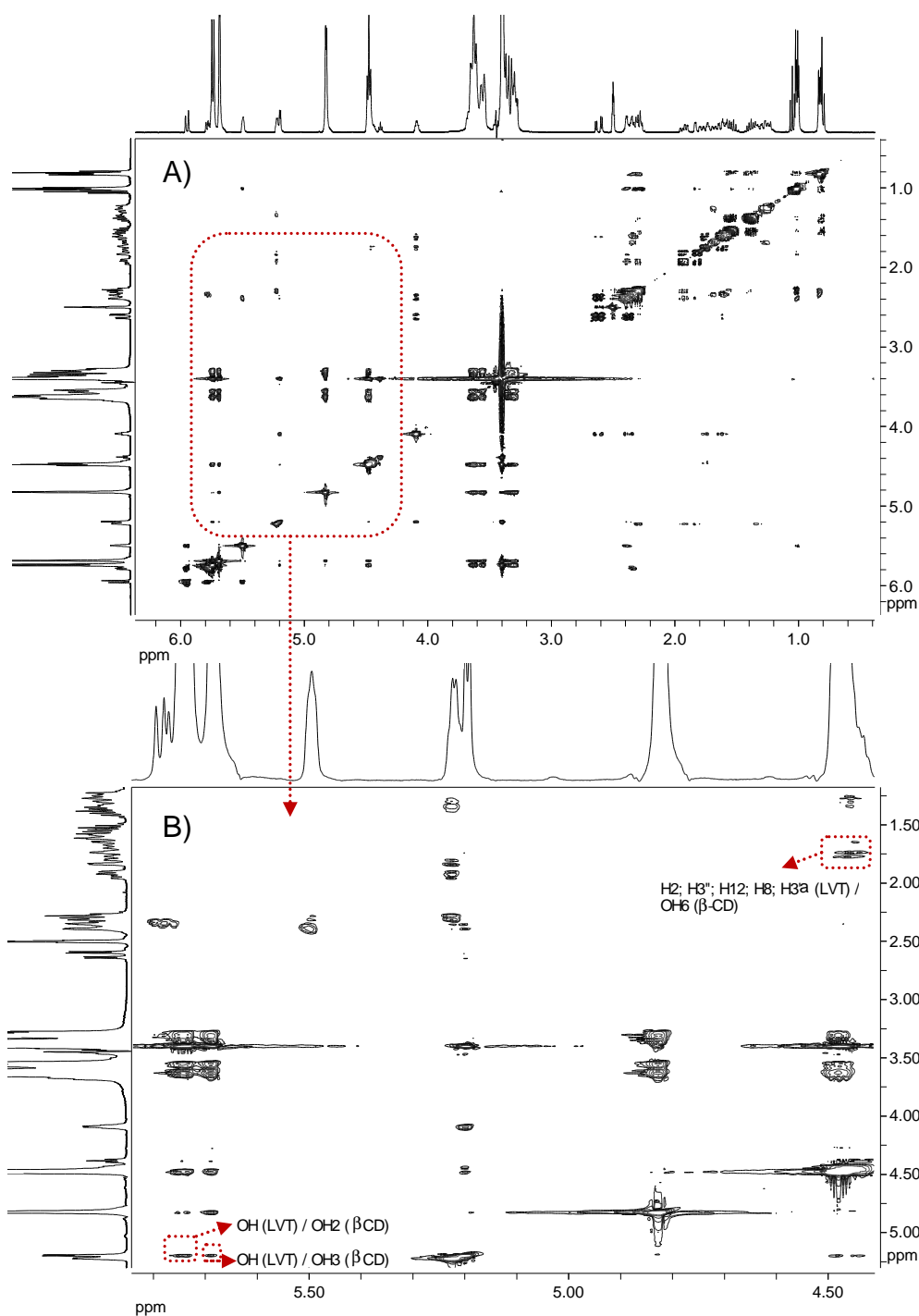


Figura 4.36: Ampliação (B) de parte do mapa de contornos 2D-ROESY (A) obtido em DMSO- $d_6$  a 400 MHz para o composto de inclusão da lovastatina preparado pela técnica de dispersão sólida, na temperatura de 27°C com tempo de mistura igual a 500mseg.

A formação de compostos de inclusão com ciclodextrinas se dá principalmente em solução, ou seja, quando as espécies estão presentes em um solvente na forma de dispersão molecular. Basicamente há deslocamento de moléculas de água e acomodação de uma molécula hóspede na cavidade lipofílica da ciclodextrina. Inicialmente, no interior da cavidade da ciclodextrina há

rompimento de ligações não covalentes com moléculas de água (ligações de hidrogênio) e estabelecimento de novas ligações apolar-apolar (van der Waals) com a molécula hóspede. Este novo composto é comparativamente mais estável energeticamente. Para toda esta produção a escolha do solvente é etapa determinante, pois ele deverá solubilizar tanto a ciclodextrina como o fármaco para viabilizar a complexação. Frequentemente o solvente escolhido é a água, sendo que em alguns casos o etanol participa do processo em porcentagens variadas. Quando a solubilidade do fármaco é muito reduzida no solvente escolhido, a eficiência de complexação diminui (LOFTSSON et al., 2007).

Posteriormente, quando este complexo for colocado novamente em meio líquido, a dissociação vai ocorrer em função da grande frequência de moléculas do solvente que circundam o complexo. Como resultado tem-se novamente as espécies livres, conforme a constante de dissociação do produto. No organismo humano isto seria esperado e quando acontecesse liberaria o fármaco para absorção. Caso isso aconteça durante os estudos de caracterização físico-química pode-se interpretar erroneamente que não houve formação do complexo. Neste caso o que ocorreu foi dissociação do complexo no meio líquido interferindo na correta interpretação dos resultados.

Na caracterização por RMN o produto é dissolvido em dimetilsulfóxido, que em função de sua maior concentração conseguiu deslocar a molécula do fármaco da cavidade da ciclodextrina. Com a remoção do fármaco o complexo é desfeito e por isso podem não ser observadas interações no mapa de contornos ROESY entre hóspede e hospedeiro. Havendo então tal competição entre o fármaco e com o deslocamento da molécula hóspede, esta última está livre então para estabelecer ligações fracas com as hidroxilas secundárias (OH2 e OH3) e primárias (OH6) presentes na superfície externa da ciclodextrina. Esta é possivelmente a justificativa para a observação de interações da SVT e LVT apenas com hidrogênios de hidroxilas presentes na superfície da  $\beta$ -CD. Pelos estudos de solubilidade de fase foi avaliado que os complexos com SVT têm constante de formação reduzida, o que facilitaria sua dissociação quando incorporados em solução. Já os compostos de inclusão com LVT não passariam por dissociação tão rápida já que a constante de formação dos complexos é significativamente maior.

Avaliando-se todos os resultados das caracterizações físico-químicas feitas percebe-se que a inclusão ocorreu parcialmente para os produtos gerados por dispersão sólida, principalmente para a SVT, onde as espécies apresentam maior superfície de contato e maiores chances de inclusão. Com a inclusão, a amorfização e estabilização deste produto amorfo têm-se seguramente ganho na velocidade de dissolução da SVT e LVT. Outra grande vantagem da dispersão sólida é a condição de produção que é relativamente simples e viável de ser transposta para uma planta industrial.





Com base nos resultados obtidos e discutidos é possível concluir que:

✓ Quanto à identificação dos fármacos:

Os fármacos escolhidos para os estudos de inclusão com a  $\beta$ -ciclodextrina foram caracterizados por diferentes técnicas físico-químicas e os resultados dos estudos de análise térmica, difração de raios-X de pó, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , desvio da luz polarizada e análise elementar permitiram identificar os mesmos.

✓ Quanto à caracterização da solubilidade dos fármacos:

A caracterização de solubilidade dos fármacos (VAL, SVT e LVT) em água, comparada a dados bibliográficos, confirmou a existência de problemas de dissolução em água dos mesmos. Já o LOG P calculado mostrou que os mesmos tem maior afinidade pela fase oleosa favorecendo assim a sua permeação no TGI. Tais problemas de dissolução, associados ao conceito de permeabilidade são base do sistema de classificação biofarmacêutica, permitem incluí-los na classe II dos ativos farmacêuticos que apresentam biodisponibilidade determinada pela dissolução e não pela permeação. A caracterização granulométrica indicou ainda que todos os produtos são micronizados e compatíveis com a superfície de contato mínimo requerida para garantir maior dissolução no TGI.

✓ Quanto aos compostos de inclusão preparados:

Os compostos de inclusão foram preparados em proporções equimolares entre VAL e  $\beta$ -ciclodextrina e 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 2D-ROESY confirmaram a interação hóspede-hospedeiro, sugerindo a formação do composto de inclusão. Através dos estudos de ressonância magnética nuclear (2D-ROESY) determinou-se a inclusão preferencial dos anéis aromáticos "b" e "c" da molécula do valsartan no interior da cavidade da ciclodextrina.

Compostos de inclusão também foram preparados em proporções equimolares entre a  $\beta$ -ciclodextrina e LVT ou SVT. Os resultados dos estudos de caracterização dos complexos não confirmaram a formação da estrutura supramolecular. Através dos resultados de difração de raios-x, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e análise térmica constatou-se maior amorfização do produto. Outros métodos de inclusão devem ser considerados de forma a proporcionar complexação das estatinas.

- ✓ Quanto à escolha da técnica de complexação do valsartan

Dentre todas as técnicas escolhidas a de solubilização com posterior liofilização mostrou-se capaz de proporcionar inclusão do valsartan na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina.

- ✓ Quanto à velocidade de dissolução do composto de inclusão contendo valsartan

Os complexos LIOF e DIS tiveram velocidade de dissolução superior à do valsartan isolado. Para LIOF o ganho na velocidade de dissolução foi de 16,7 vezes e para DIS o ganho foi de 2,7 vezes.

- ✓ Quanto à liberação sustentada do valsartan e à atividade anti-hipertensiva.

A avaliação da ação anti-hipertensiva do valsartan e do composto de inclusão, preparado por liofilização, utilizando o método de telemetria demonstrou que a ação do valsartan incluído na ciclodextrina foi controlada e de forma sustentada se comparado ao fármaco isolado. O valsartan na forma livre, em uma única dose de  $1,14 \text{ mg.Kg}^{-1}$  por via oral proporcionou redução significativa da pressão arterial por dois após gavagem. Já o complexo LIOF, na dose de  $4,22 \text{ mg.Kg}^{-1}$  equivalente a  $1,14 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , por apresentar melhor solubilidade e funcionar com sistema de liberação sustentada, apresentou efeito mais rápido e duradouro chegando a 4 dias. Esses resultados juntamente com a caracterização da dissolução intrínseca mostraram que a maior solubilidade do complexo LIOF tem relação com o aumento da biodisponibilidade do valsartan e maior eficiência do fármaco.

1. ACHÉ. Monografia do Feldene cápsulas de uso oral. Disponível em <<http://www.ache.com.br>>. Acesso em 5 de abril de 2010.
2. AHUJA, N.; KATARE, O. P.; SINGH, B. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n.65, p.26–38, 2007.
3. AL OMARI, M. M.; ZUGHUL, M. B.; DAVIES, J. E. D.; BADWAN, A. A. Sildenafil / cyclodextrin complexation: Stability constants, thermodynamics, and guest–host interactions probed by  $^1\text{H}$  NMR and molecular modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p.857-865, 2006.
4. ALI, S. M.; ASMAT, F.; MAHESHWARI, A.; KOKETSU, M. Complexation of fluoxetine hydrochloride with  $\beta$ -cyclodextrin. A proton magnetic resonance study in aqueous solution. *IL Farmaco*, v.60, p.445–449, 2005.
5. ALI, S. M.; MAHESHWARI, A.; ASMAT, F.; KOKETSU, M. Complexation of enalapril maleate with  $\beta$ -cyclodextrin: NMR spectroscopic study in solution. *Química Nova*, v. 29, p. 685-688, 2006.
6. 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.
7. ARAÚJO, M. V. G.; VIEIRA, E. K. B.; LÁZARO, G. S.; CONEGERO, L. S.; FERREIRA, O. P.; ALMEIDA, L. E.; BARRETO, L. S.; COSTA JR., N. B.; GIMENEZ, I. F. Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: characterization, phase solubility and molecular modelling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.15, p.5752–5759, 2007.
8. AULTON, M. E. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. New York: Churchill Livingstone. 2ª Edição. 2001. 752p
9. BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature*, v.1, p.882-894, 2002.
10. BARBOUR, N. P. & LIPPER, R. A. Introduction to biopharmaceutics and its role in drug development. In: KRISHNA, R. & YU, L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. 1ª edição. New York: Springer, 2007. Cap. 1, p.1-25.
11. BASTAMI, S. M. & GROVES, M. J. Some factors influencing the in vitro release of phenytoin from formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. v.01, p.151-164, 1978.

12. BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. *Pharmaceutical Research*, v.18, p.859-866, 2001
13. BAYOMI, M. A.; ABANUMAY, K. A.; AL-ANGARY, A. A. Effect of inclusion complexation with cyclodextrins on photostability of nifedipine in solid state. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 243, p.107–117, 2002.
14. BÉNI, S.; SZAKÁCS, Z.; CSERNÁK, O.; BARCZA, L.; NOSZÁL, B. Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.30, p.167-174, 2007.
15. BERNINI, A.; SPIGA, O.; CIUTTI, A.; SCARSELLI, M.; BOTTONI, G.; MASCAGNI, P.; NICCOLAI, N. NMR studies of the inclusion complex between  $\beta$ -cyclodextrin and paroxetine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, p.445-450, 2004.
16. BETTINETTI, G.; NOVÁK, C.; SORRENTI, M. Thermal and structural characterization of commercial  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\delta$ -cyclodextrins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.68, p.517-529, 2002.
17. BIETTI, G.; DUBINI, E.; MAFFIONE, G.; VIDI, A. Inclusion compounds of nimesulida with cyclodextrins. European Patent number: 0534995 B1. 28.12.1994.
18. 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.
19. BORGHETTI, G. S.; LULA, I. S.; SINISTERRA, R. D.; BASSANI, V. L. Quercetin/ $\beta$ -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS PharmSciTech*, v.10, p.235-242, 2009.
20. BRAMANTI, G.; MURA, P.; LIGUORI, A.; CECCARELLI, L.; SANTONI, G.; GROSSI, G.; TORRESI, M. C. Pharmaceutical availability of digoxin tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. v.49, p.241-247, 1989.
21. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 310, de 01 de setembro de 2004. “Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução”. In: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15466&word>= Brasília: ANVISA, 2004.
22. BRENNER, G. S; ELLISON, D. K.; KAUFMAN, M. J. Lovastatin. In: *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. San Diego: ACADEMIC PRESS, 1992, p.277-306.
23. BREWSTER, M. E. & LOFTSSON, T.; Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.645–666, 2007.
24. BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11ª edição. New York: McGraw-Hill, 2005. 1984 p.

25. BYRN, S. R.; XU, W.; NEWMAN, A. W. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48, p.115–136, 2001.
26. CACIGAL, E.; GONZÁLEZ, L.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n.3, v.26, p.477-486, 2001.
27. CALABRÒ, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.35, p.365–377, 2004.
28. CAPPELLO, B.; DI MAIO, C.; IERVOLINO, M.; MIRO, A. Improvement of Solubility and Stability of Valsartan by Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.54, n.3-4, p. 289-294, 2006
29. CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with  $\beta$ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v.182, p.59-69, 1999.
30. CEJKA, J.; KRATOCHVÍL, B.; IVANA CÍSARVÁ; JEGOROV, A. Simvastatin. *Acta Crystallographica Section C. Crystal Structure Communications*, v.C59, p.o428-o430, 2003.
31. CHARUMANEE, S.; TITWAN, A.; SIRITHUNYALUG, J.; WEISS-GREILER, P.; WOLSCHANN, P.; VIERNSTEIN, H.; OKONOGI, S. Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, p.523–529, 2006.
32. CHUNGI, S. & IORIO, T. L. Combination dosage form containing individual dosage units of a cholesterol-lowering agent, an inhibitor of the renin-angiotensin system, and aspirin. UNITED STATES PATENT number: 6,669,955. 30 dec. 2003.
33. CONNORS, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews*, v.97, p.1325-1357, 1997.
34. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2000. 49p.
35. CRIQUI, M. H. Epidemiologia da doença cardiovascular. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. *Tratado de Medicina Interna*. 21ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2001. Cap. 39, p. 189-193.
36. CROWDER, T. M. ; HICKEY, A. J.; LOUEY, M. D.; ORR, N.; *A guide to pharmaceutical particulate science*. Boca Raton, Florida: Interpharm / CRC Press LLC, 2003. 236p
37. CSEMPESZ, F.; SULE, A.; PUSKAS, I. Induced surface activity of supramolecular cyclodextrin–statin complexes: Relevance in drug delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.354, p.308–313, 2010.

38. DENADAI, A. M. L.; IANZER, D.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SANTORO, M. M.; SANTOS, C. F. F.; LULA, I. S.; CAMARGO, A. C. M.; FALJONI-ALARIO, A.; SANTOS, R. A. S.; SINISTERRA, R. D. Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with  $\beta$ -cyclodextrin: Physical–chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.90-98, 2007.
39. DOHERTY, A. M. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. v.40. London: Elsevier, 2005. 542p.
40. DOMINGUES, Z. R.; CORTÉS, M. E.; GOMES, T. A.; DINIZ, H. F.; FREITAS, C. S.; GOMES, J. B.; FARIA, A. M. C.; SINISTERRA, R. D. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with  $\beta$ -cyclodextrin. *Biomaterials*, v. 25, p.327–333, 2004.
41. 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  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A*, v.61, p.1051-1057, 2005.
42. EPA. United States Environmental Protection Agency. Product Properties Test Guidelines. OPPTS 830.7550. Partition Coefficient (n-octanol/water) Shake Flask Method. August. 1996.
43. FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII – 7ª EDIÇÃO. Lisboa: Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento. 3583p. 2002
44. 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.
45. FICARRA, R.; TOMMASINI, S.; RANERI, D.; CALABRÒ, M. L.; DI BELLA, M. R.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, M. C.; FICARRA, P. Study of flavonoids/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.29, p.1005–1014, 2002.
46. FLORENCE, A.T.; SALOLE, E.G.; STENLAKE, J.B.; The effect of particle size reduction on digoxin crystal properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n.26, v.6, p.479-480, 1974.
47. FONSECA, F. A. H. Pharmacokinetics of statins. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.85, p.9-14, 2005.
48. FONSECA, L.C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Química Nova*, v.29, p. 543-548, 2006.
49. FRIDRIKSDÓTTIR, H.; LOFTSSON, 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, p.39-42, 1996.

50. FRÖMMING, K. L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in Pharmacy. Dordrecht: Klumer Academic Publishers. 1993. 225p.
51. FRONZA, G.; MELE, A.; REDENTI, E.; VENTURA, P. <sup>1</sup>H NMR and molecular modeling study on the inclusion complex β-cyclodextrin-indomethacin. *Journal of Organic Chemistry*, v.61, p.909-914, 1996.
52. GIBAUD, S.; ZIRAR, S. B.; MUTZENHARDT, P.; FRIES, I.; ASTIER, A. Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.306, p.107–121, 2005.
53. GIBSON, M. *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*. Boca Raton: Informa Healthcare. 1ª Edição. 2001. 596p.
54. GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R.; thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, v.380, p.123-151, 2001.
55. GLEIM, G. W.; RUBINO, J.; ZHANG, H.; SHAHINFAR, S.; SOFTER, B.A.; MEDL; LYLE, P. A.; LITTLEJOHN III, T. W.; FEIG, P. U. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group trial of the antihypertensive efficacy and tolerability of a combination of once-daily losartan 100 mg/hydrochlorothiazide 12.5 mg compared with losartan 100-mg monotherapy in the treatment of mild to severe essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, v.28, n.10, p.1639, 2006.
56. GRADMA, A.H.; BRADY, W. E.; GAZDICK, L. P.; LYLE, P.; ZELDIN, R. K. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, 8-week trial of the efficacy and tolerability of once-daily losartan 100mg/hydrochlorothiazide 25 mg and losartan 50 mg/hydrochlorothiazide 12.5 mg in the treatment of moderate-to-severe essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, v.24, p.1049-1061, 2002.
57. GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J.; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. *Crystal Growth & Design*, v.8, p.128-135, 2008.
58. GUO, M.; KALRA, K.; WILSON, W.; PENG, Y.; AUGSBURGER, L. L. A Prototype Intelligent Hybrid System for Hard Gelatin Capsule Formulation Development. *Pharmaceutical Technology*, September, p.44-60, 2002.
59. GUYTON, A. C. & HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 973p
60. HANCOCK, B. C. Amorphous Pharmaceutical Systems. In: SWARBRICK, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3ª edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. v.1, p.83-91.
61. HARROLD, M. W. The Influence of Conformational Isomerism on Drug Action and Design. *American Journal of Pharmaceutical Education*, v.60, p.192-197, 1996.



62. HIGUCHI, T. & CONNORS, K. Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, v.4, p.117-212, 1965.
63. HINTZ, R. J. & JOHNSON, K. C. The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. v.51, p.9-17, 1989.
64. 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, n.3, p. 585-592, 2007.
65. III DIRETRIZES Brasileiras sobre Dislipidemia e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.77, suplemento III, p.1-48, 2001.
66. IMS HEALTH. Disponível em: <<http://www.imshealth.com>>. Acesso em: 31 de março de 2010.
67. IRIE, T. & UEKAMA, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.36, p.101-123, 1999.
68. 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.
69. JULLIAN, C.; MIRANDA, S.; ZAPATA-TORRES, G.; MENDIZÁBAL, F.; OLEA-AZAR, C. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.15 p. 3217–3224, 2007.
70. JULLIAN, C.; OROSTEGUIS, T.; PÉREZ-CRUZ, F.; SÁNCHEZ, P.; MENDIZABAL, F.; OLEA-AZAR, C. Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin: A thermodynamic and reactivity study. *Spectrochimica Acta Part A*, v.71, n.1, p.269-275, 2008.
71. JULLIAN, C.; OROSTEGUIS, T.; PÉREZ-CRUZ, F.; SÁNCHEZ, P.; MENDIZABAL, F.; OLEA-AZAR, C. Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin: a thermodynamic and reactivity study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.71, p.269-275, 2008.
72. JUN, S. W.; KIM, M.S; KIM, J. S.; PARK, H. J.; LEE, S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. Preparation and characterization of simvastatin / hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n.3, p.413-421, 2007.
73. KARATHANOS, V. T.; MOURTZINOS, I.; YANNAKOPOULOU, K.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure inclusion complex of vanillin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry*, v.101, p.652–658, 2007.
74. KIBBE, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Washington: American Pharmaceutical Association and London: Pharmaceutical Press. 2001

75. KIM, J. S.; KIM, M. S.; PARK, H. J.; JIN, S. J.; LEE, S.; HWANG, S. J. Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process. *International Journal of Pharmaceutics*, v.359, p.211–219, 2008.
76. KOESTER, L. S.; BERTUOL, J. B.; GROCH, K. R.; XAVIER, C. R.; MOELLERKE, R.; MAYORGA, P.; DALLA COSTA, T.; BASSANI, V. L. Bioavailability of carbamazepine:β-cyclodextrin complex in beagle dogs from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, p.201–207, 2004.
77. KRISHNA, R.; YU, L. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Springer US. 1ª Edição. 2009. 420p.
78. LACOURCIÈRE, Y. & POIRIER, L. Antihypertensive effects of two fixed-dose combinations of losartan and hydrochlorothiazide versus hydrochlorothiazide monotherapy in subjects with ambulatory systolic hypertension. *American Journal of Hypertension*, v. 16, p.1036-1042, 2003.
79. LAI, S.; LOCCI, E.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; LAI, A.; MARONGIU, B. Imazalil-cyclomaltoheptaose (β-cyclodextrin) inclusion complex: preparation by supercritical carbon dioxide and <sup>13</sup>C CPMAS and <sup>1</sup>H NMR characterization. *Carbohydrate Research*, v.338, p.2227-2232, 2003.
80. LAMCHARFI, E.; KUNESCH, G.; MEYER, C; ROBERT, B. Investigation of cyclodextrin inclusion compounds using FT-IR and Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, v.51, p.1861 - 1870, 1995.
81. LANG, R. F. Reactivity of hydroxymethylglutaryl coenzyme a (hmg-coa) reductase inhibitors containing conjugated dienes with phenolic antioxidants in the solid-state. UNITED STATES PATENT Application number: 20080312458. 18 dec. 2008.
82. LEE, J.; HÁ, T.; PARK, C. LEE, H.; LEE, G.; CHANG, Y. Process for the preparation of simvastatin. UNITED STATES PATENT APLICATION PUBLICATION number: US 2005/0080275 A1, 14 Apr. 2005.
83. LI, F; ZHANG, H.; JIANG, L.; ZHANG, W.; NIE, J.; FENG, Y.; YANG, M.; LIU, M. Dynamic NMR study and theoretical calculations on the conformational exchange of valsartan and related compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.45, p.929–936, 2007.
84. LOFTSSON, T. & BREWSTER, E. M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins - Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmeutical Scinces*, v.85, p.1017–1025, 1996
85. LOFTSSON, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.44, p.63–67, 2002
86. LOFTSSON, T. Cyclodextrins in pharmacaceutical formulation. The effects of polymers on their complexation efficacy and drug availability. A report prepared for Nordic Industrial Fund, 1998.
87. LOFTSSON, T.; HREINSDOÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.57, p.545–552, 2007.

88. MAHMUD, A. & FEELY, J. Low-dose quadruple antihypertensive combination more efficacious than individual agents—a preliminary report. *Hypertension*, v.49, p.272-275, 2007.
89. MANCA, M. L.; ZARU, M.; ENNAS, G.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LOY, G.; FADDA, A. M. Diclofenac- $\beta$ -Cyclodextrin Binary Systems: Physicochemical Characterization and In Vitro Dissolution and Diffusion Studies. *AAPS PharmSciTech*, v.6, n.3, E464-E472, 2005.
90. MARTI, E. E. Crystalline salt forms of valsartan. UNITED STATES PATENT number: US 6,869,970 B2. 22, mar., 2005.
91. MARTIN DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, n.39, p.1033-1046, 2004.
92. 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.
93. MCMINN, W. A. M.; AL-MUHTASEB, A. H.; MAGEE, T. R. A. Enthalpy–entropy compensation in sorption phenomena of starch materials. *Food Research International*, v.38, p.505-510, 2005.
94. MEHRAMIZI, A.; ASGARI MONFARED, E.; POURFARZIB, M.; BAYATI, K. H.; DORKOOSH, F. A.; RAFIEE–TEHRANI, M. Influence of  $\beta$ -cyclodextrin complexation on lovastatin release from osmotic pump tablets (OPT). *DARU*, v.15, p.71-78, 2007.
95. MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; GALICHET, L. Y. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3ª edição. Londres: Pharmaceutical Press, 2003. 2136p.
96. MORAES, C. M.; ABRAMI, P.; PAULA, E.; BRAGA, A. F. A.; FRACETO, L. F.; Study of the interaction between S(–) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin.. *International Journal of Pharmaceutics*, n.331, p.99–106, 2007.
97. MOSHER, G & THOMPSON, D. O. Complexation: Cyclodextrins. In: SWARBRICK, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3ª edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. v.2, p.671-1434.
98. MURA, P.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug cyclodextrin interactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.73 p.635-646, 2003.
99. MYERS, M.; SANGHVI, P. P.; Controlled release compositions and methods for the treatment of hyperlipidemia. UNITED STATES PATENT number: 6,090,830. 18 jul. 2000.
100. NEWMAN, A. W. & BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. *Drug Discovery Today*, v.8, p.898-905, 2003
101. OBAIDAT, A. A.; KHANFAR, R. A.; KHAWAM, M. N. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the solubility and dissolution rate of meloxicam and investigation of the driving force for complexation using molecular modeling. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.63, p.273–279, 2009.

102. OPARIL, S. Hipertensão arterial. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. Tratado de Medicina Interna. 21ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2001. Cap.55, p.289-304.
103. 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.
104. PATEL, R. P. & PATEL, M. M. Preparation and evaluation of inclusion complex of the lipid lowering drug lovastatin with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.6, p.25-36, 2007a.
105. PATEL, R. P. & PATEL, M. M. Physico-chemical characterization & in vitro dissolution behavior of simvastatin-cyclodextrin inclusion compounds. *Drug delivery technology*, v.7, p.50-56, 2007c.
106. PATEL, R. P. & PATEL, M. M. Solid-State Characterization and Dissolution Properties of Lovastatin Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. *Pharmaceutical Technology*, v.2, 2007b
107. PFLAUM, Z.; SALOBIR, M.; JERALA, Z.; RESMAN, A. Solid pharmaceutical formulation containing lovastatina and sinvastatina respectively, and its preparation. UNITED STATES PATENT number: US 6,984,399 B2. 10, jan., 2006.
108. POTEMKIN, V. A.; ARSLAMBEKOV, R. M.; BARTASHEVICH, E. V.; GRISHINA, M. A.; BELIK, A. V.; PERSPICACE, S.; GUCCIONE, S. Multiconformational method for analyzing The biological activity of molecular structures. *Journal of Structural Chemistry*, v.43, p.1045-1049, 2002
109. PRAVIN, N.; BABASAHEB, A.; NEHA, D.; VILASRAO, K.; RAJASHREE, H. Solid state characterization of the inclusion complex of valsartan with methyl  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, article in press. 2009.
110. QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G. G. Z.; LIU, L.; Porter, w. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice*. New York: Academic Press. 1ª Edição. 2009. 978p.
111. 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.
112. RILEY, T. N.; RUITER, J.; RAVIS, W. R.; CLARK, C. R. Isomerism. In: SWARBRICK, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3ª edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. v.4, p.2142-2163, Isomerism.
113. ROCHA, F. R. P. & TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento da sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, v.27, n.5, p.807-812, 2004.
114. ROLLINGER, J. M. & BURGER, A. Physico-chemical characterization of hydrated and anhydrous crystal forms of amlodipine besylate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.68, p.361-372, 2002.

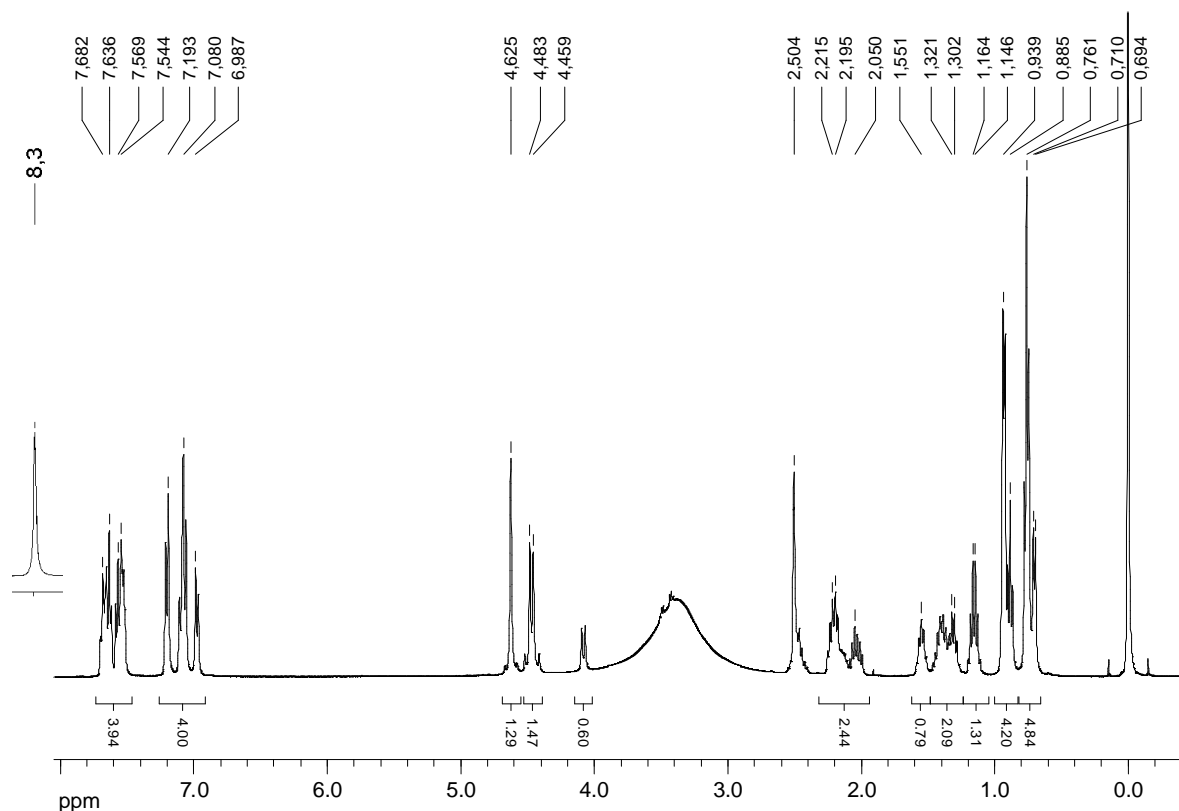
115. ROSS, P. D. & REKHARSKY, M. V. Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. *Biophysical Journal*, v.71, n.4, p.2144-2154, 1996.
116. RUKHMAN, I.; FLYAKS, E.; KOLTAI, T.; ARONHIME, J. Polymorphs of valsartan. UNITED STATES PATENT number: US 2005/0222233 A1. 06 out, 2005.
117. SCHNEIDER, H.J.; HACKET, F.; RÜDIGER, V. IKEDA, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Chemical Reviews*, v.98, p.1755-1785, 1998.
118. SERAJUDDIN, A. T. M.; RANADIVE, S. A.; MAHONEY, E. M. Relative lipophilicities, solubilities, and structural-pharmacological considerations of 3-hidroxy-3methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.80, n.9, p.830-834, 1991.
119. SHIRALASHETTI, S.; PATIL, A.; PATIL, J. Influence of method of preparation on solubility, physicochemical properties and in-vitro release profile of SVT- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: A comparative study. *International Journal of ChemTech Research*, v.2, p.562-571, 2010.
120. SILVA, T. D.; RESENDE, J. A. L. C.; ARANTES, V. T.; SPEZIALI, N. L.; OLIVEIRA, R. B.; VIANNA-SOARES, C. D. SOLID DISPERSIONS OF SIMVASTATIN WITH POLYETHYLENE GLYCOL TO IMPROVE SOLUBILITY. II Latin-American Symposium on Polymorphism and Crystallization in Drugs and Medicines. 9-11 março 2009
121. SILVEIRA, A. M. Formulation et caractérisation de nanoparticules combinées de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) et de cyclodextrines destinées à l'administration de principes actifs faiblement solubles dans l'eau. 1998. 149p. Tese de Doutorado. Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry - Université Paris XI. Paris.
122. SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. Spectrometric identification of organic compounds. Hoboken: John Wiley & Sons Inc. 6ª Edição. 1997. 496p
123. SINGHAL, D. & CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.335– 347, 2004.
124. SOUZA, M. A. F.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, M. C. D.; SOLEDAD, L. E. B.; SOUZA, A. G. Thermal and kinetic study of statins simvastatin and lovastatin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 87, p.859–86, 2007.
125. SPAMER, E.; MULLER, D. G.; WESSELS, P. L. VENTER, J. P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.16, p.247–253, 2002.
126. SÜLE, A. & CSEMPESZ, F. Complexation of statins with  $\beta$ -cyclodextrin in solutions of small molecular additives and macromolecular colloids. *Progress in Colloid and Polymer Science*, n.135, p. 93–100, 2008.

127. SUN, D. Z.; LI, L.; QIU, X. M.; LIU, F.; YIN, B. L. Isothermal titration calorimetry and <sup>1</sup>H NMR studies on host–guest interaction of paeonol and two of its isomers with β-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, n.316, p.7–13, 2006.
128. SUN, H.; GONG, J.; KANG, J. Solubility of Lovastatin in Acetone, Methanol, Ethanol, Ethyl Acetate, and Butyl Acetate between 283 K and 323 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 50, p.1389-1391, 2005.
129. SUNDARAM, V.; KHARKAR, M. R.; YARRAGUNTLA, S. R.; GUDIPATI, S.; MANDAVA, V. N. B. R.; IORIO, T. L. Amorphous simvastatin. UNITED STATES PATENT APLICATION PUBLICATION number: US 2006/0223882 A1, 05 Oct. 2006.
130. SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.36, p.17-28, 1999.
131. THE MERCK INDEX. 2000. Twelfth Edition on CD-ROM. Version 12:3. Editors: BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.; OBENCHAIN, J.
132. THE NINTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CYCLODEXTRINS. May 31 - June 3, 1998, Santiago de Compostela. Proceedings... Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.
133. The United States Pharmacopoeia: USP 31: The National Formulary: NF 26. Rock Ville: United States Pharmacopoeia Convention, 2008.
134. THOMPSON, D. O. Cyclodextrins – enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.14, n.1, p.1-104, 1997.
135. TIRUCHERAI, G. S. & MITRA, A. K. Effect os hydroxypropyl beta cyclodextrin complexation on aqueous solubility, na corneal permeation of acyl ester prodrugs of ganciclovir. *AAPS Pharmscitech Journal*, v.4, n.3, p.1-12, 2003.
136. TOBERT, J. A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-COA reductase inhibitors. *DRUG DISCOVERY*, v.2, p.517-526, 2003.
137. TSRL INC. Enhancing oral absorption of drug candidates. [SI]. Disponível em: <<http://www.tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>>. Acesso em: 31 de março de 2010.
138. TUBIC-GROZDANIS, M.; BOLGER, M. B.; LANGGUTH, P. Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds. *AAPS Journal*, v.10, p.213-226, 2008.
139. UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T.; Cyclodextrin Drug Carrier Systems, *Chemical Reviews*, v.98, p.2045-2076, 1998.
140. V DIRETRIZES Brasileiras de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH). São Paulo: São Paulo, 2006.
141. VAN HEES, T.; BARILLARO, V.; PIEL, G.; BERTHOLET, P.; HENRY DE HASSONVILLE, S.; EVRARD, B.; DELATTRE, L. Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Preparation of

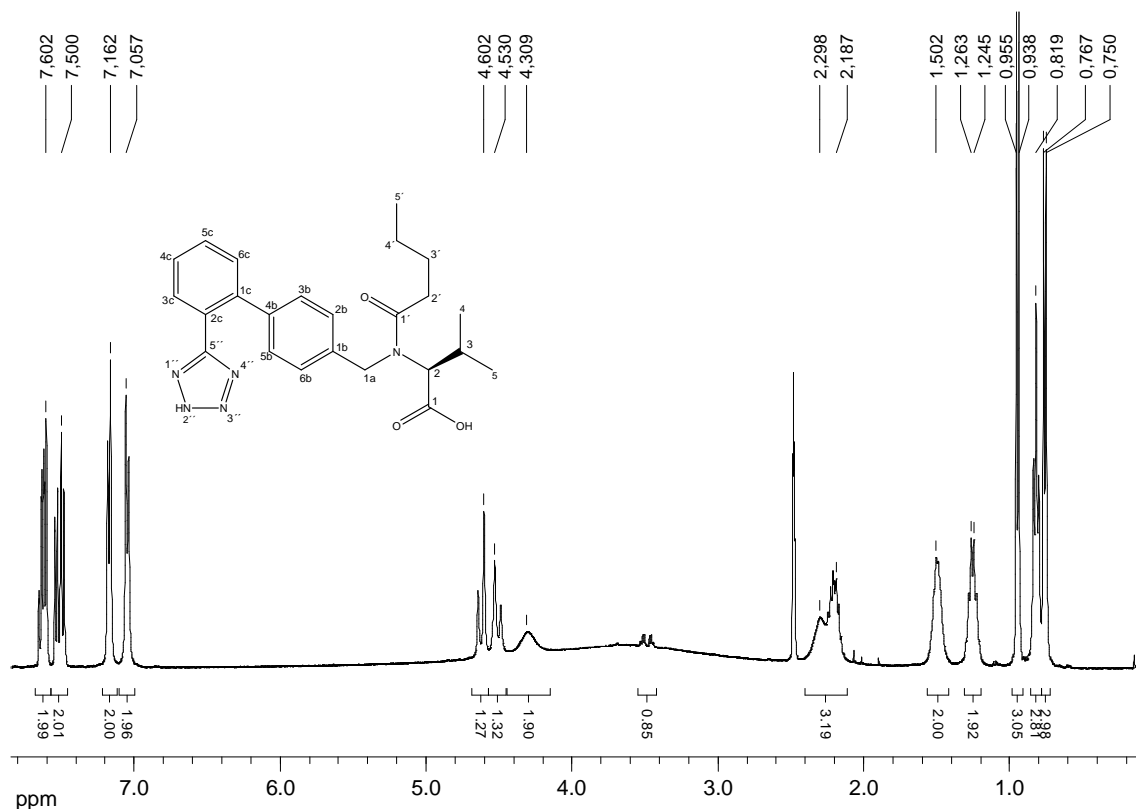
- Drug-Cyclodextrin Inclusion Compounds. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.44, p.271–274, 2002.
142. WATERBEEMD, H.; TESTA, B.; MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*. Wiley-VCH; 2ª Edição. 2008. 649p.
143. WEBB, R. L.; de GASPARO, M.; Method of treatment and pharmaceutical composition. UNITED STATES PATENT number: 6,204,281. 20 mar. 2001.
144. WHO - World Health Organization. Adherence to long-term therapies. Evidences for action. 2003
145. WILLIAMS III, R. O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.46, p.355–360, 1998.
146. 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.
147. XAVIER, W. P. Preparação e caracterização de dispositivos de liberação controlada de Losartan utilizando ciclodextrinas e polímeros biodegradáveis. 2004. 256p. Tese de doutorado. Departamento de Química – ICEX – UFMG. Belo Horizonte.
148. YAP, K. L.; LIU, X.; THENMOZHIAL, J. C.; HO, P. C. Characterization of the 13-cis-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.25, p.49–56, 2005.
149. YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48, p.27–42, 2001
150. YUEXIAN, F.; JUNFEN, L.; CHUAN, D. Preparation and study on the inclusion complexes of two tanshinone compounds with  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A*, v.61, p.135–140, 2005.
151. 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.



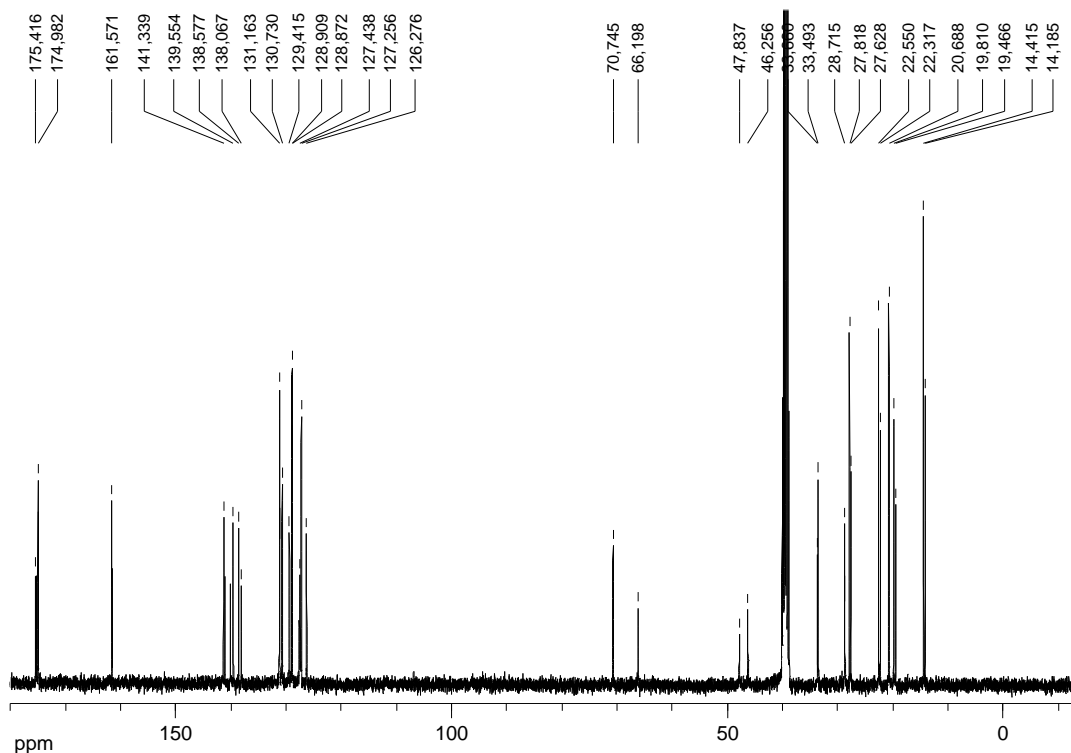




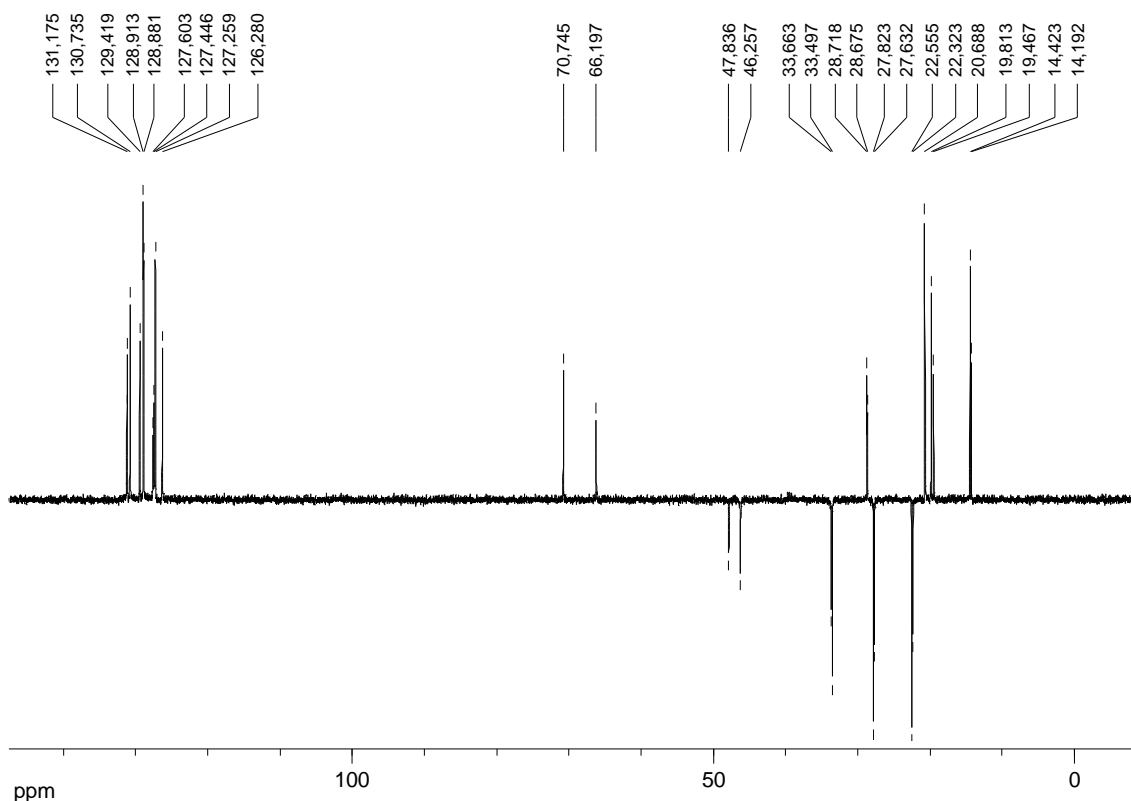
Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de 27°C.



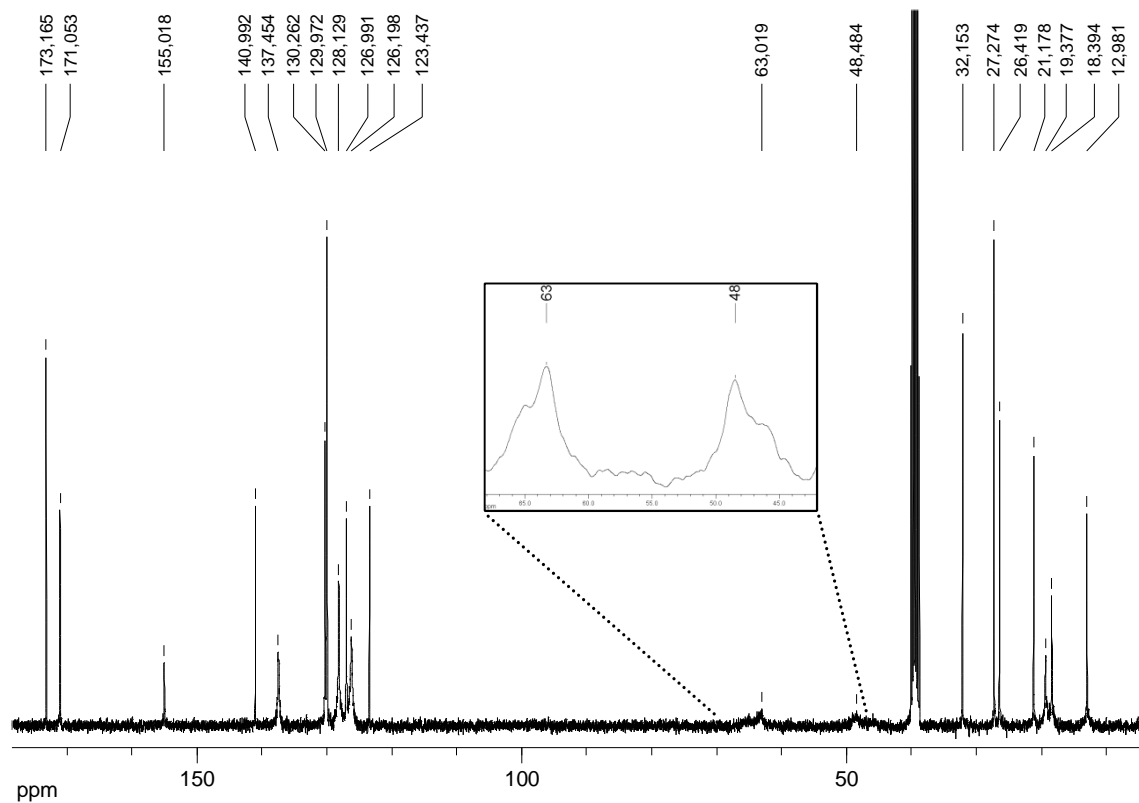
Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de 107°C.



Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de 27°C.



Subespectro de ressonância magnética DEPT 135 em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de 27°C.



Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de  $107^\circ\text{C}$ .

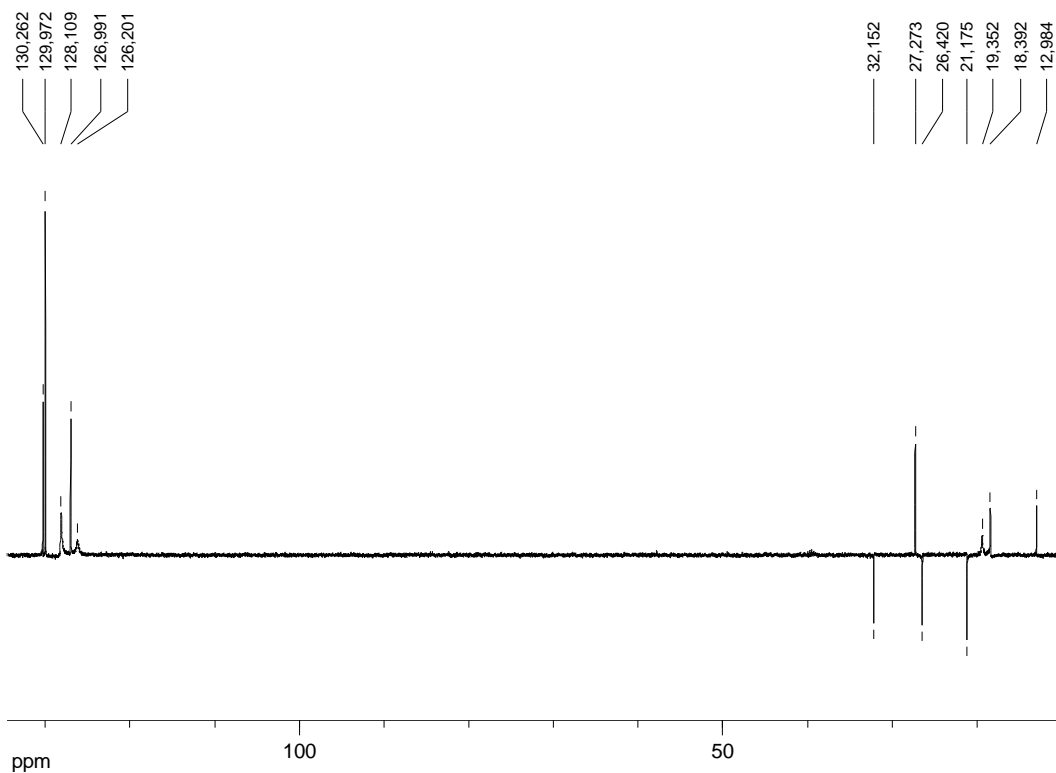
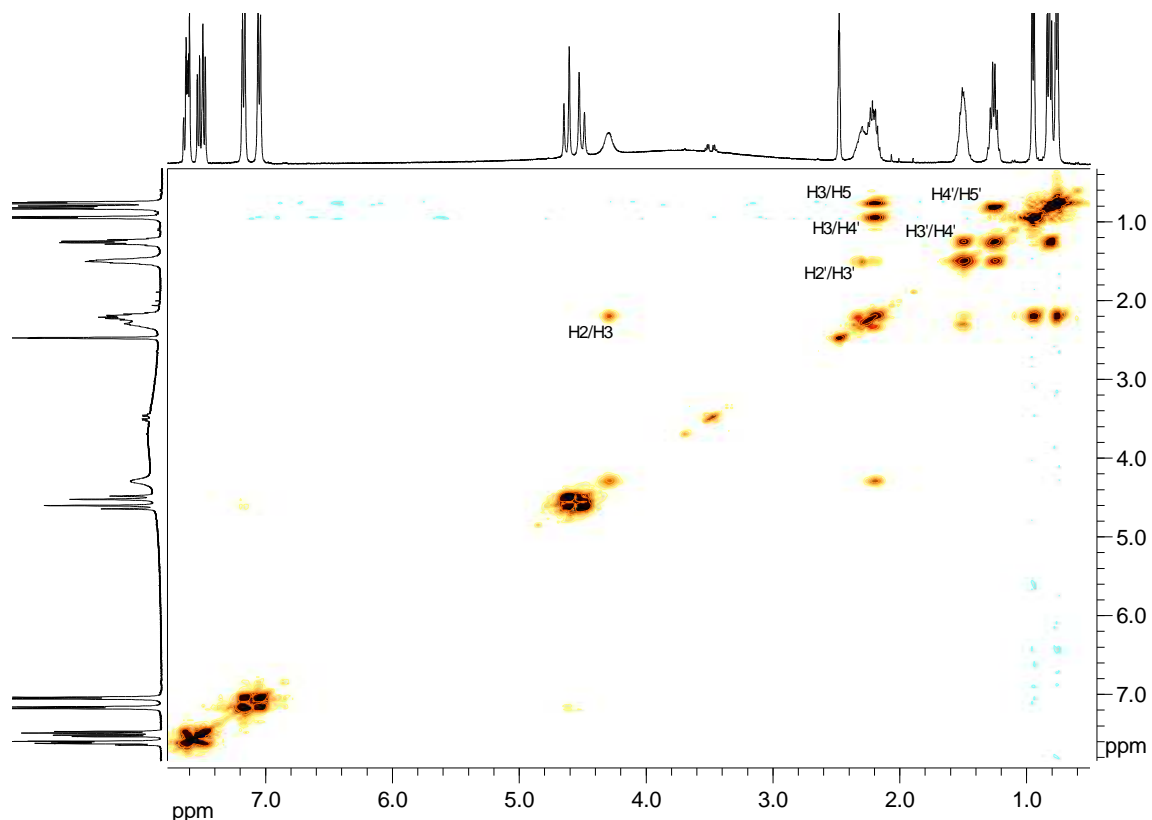
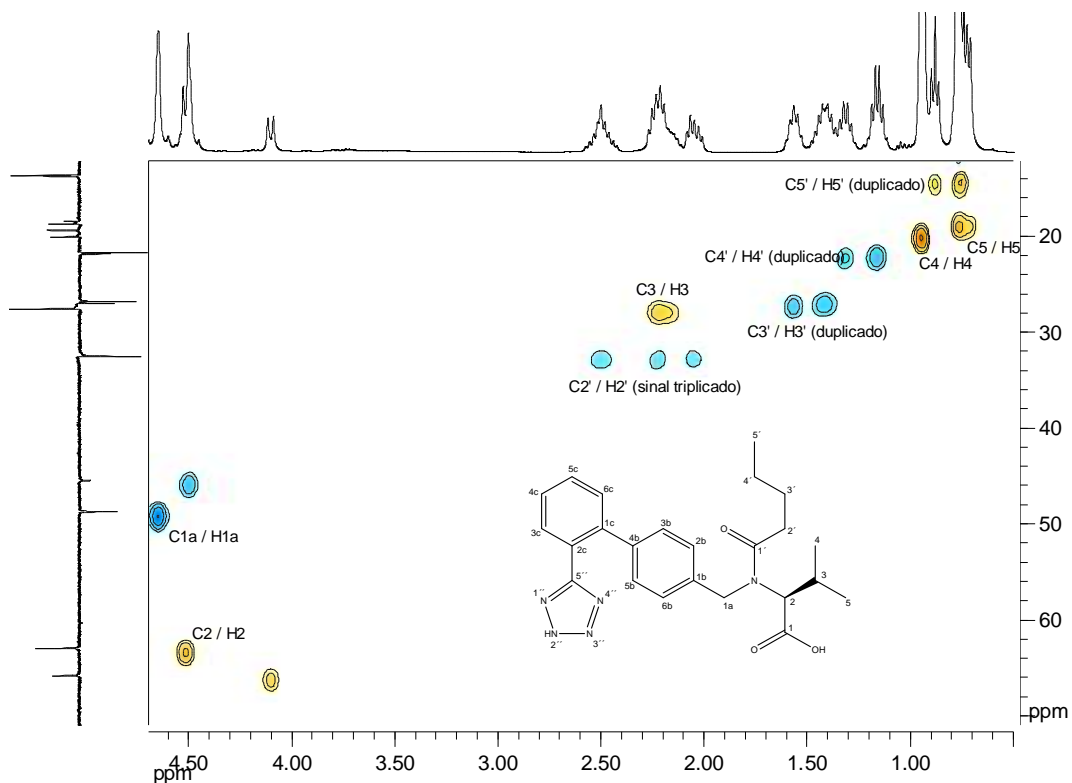


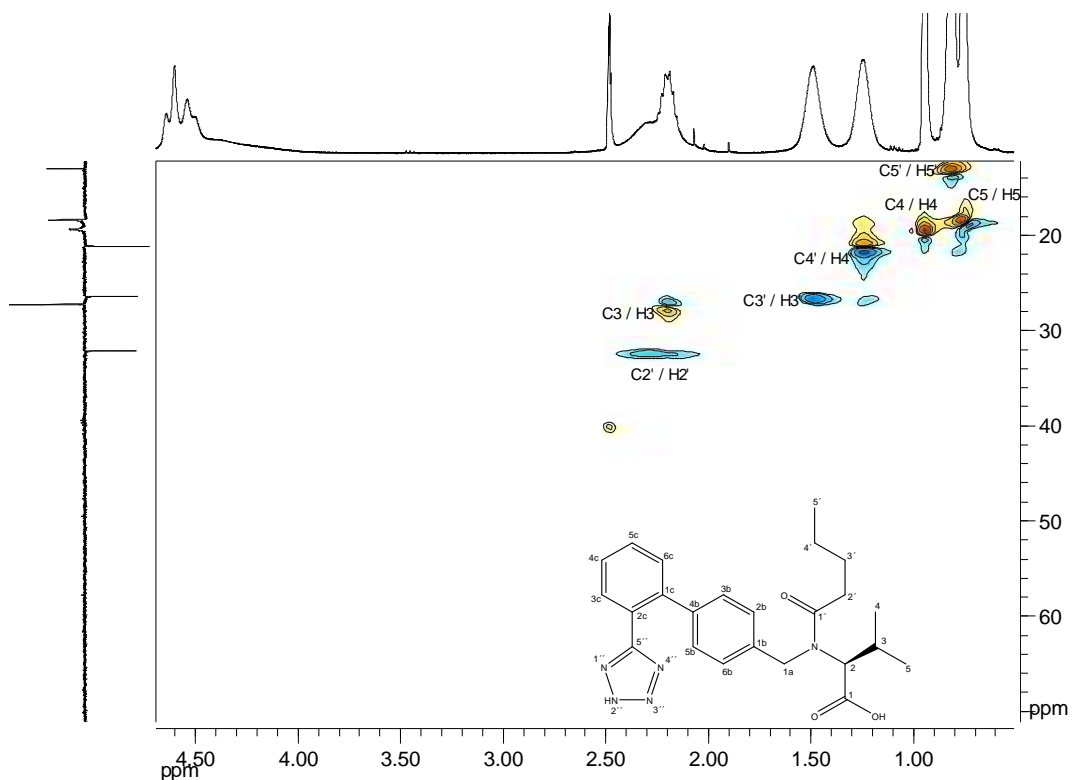
Figura 3.15. Subespectro de ressonância magnética DEPT 135 em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para o valsartan na temperatura de  $107^\circ\text{C}$ .



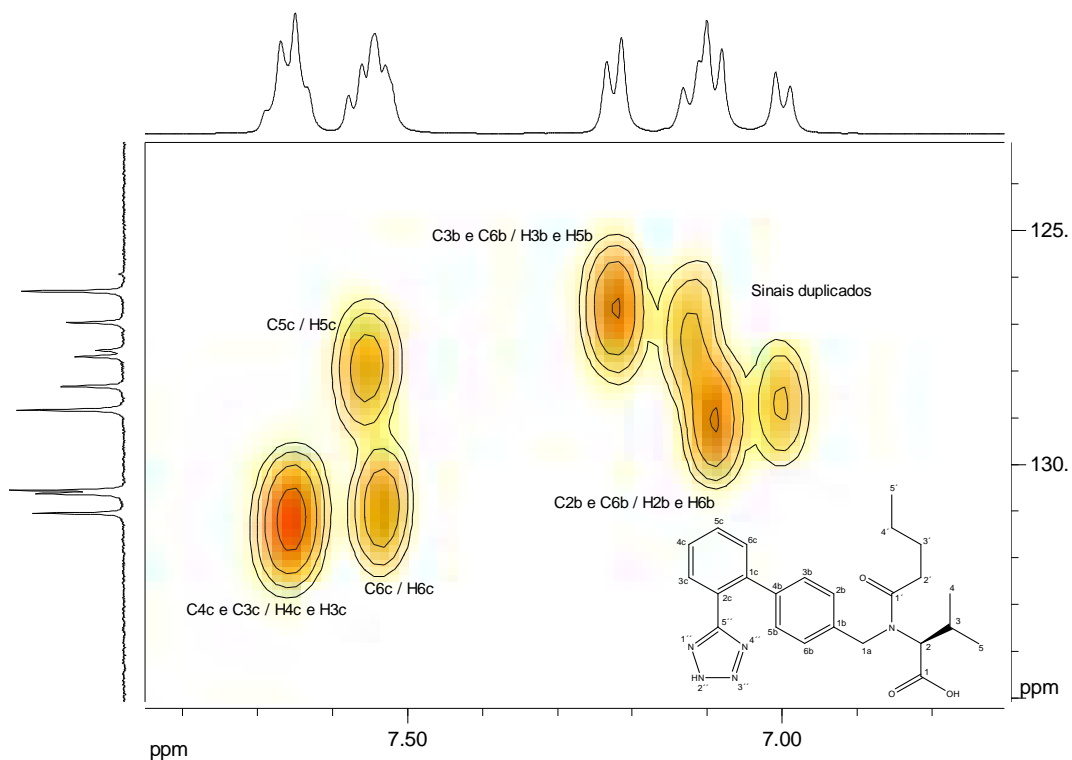
Mapa de contornos COSY do valsartan em DMSO- $d_6$  (400 MHz) a 107°C.



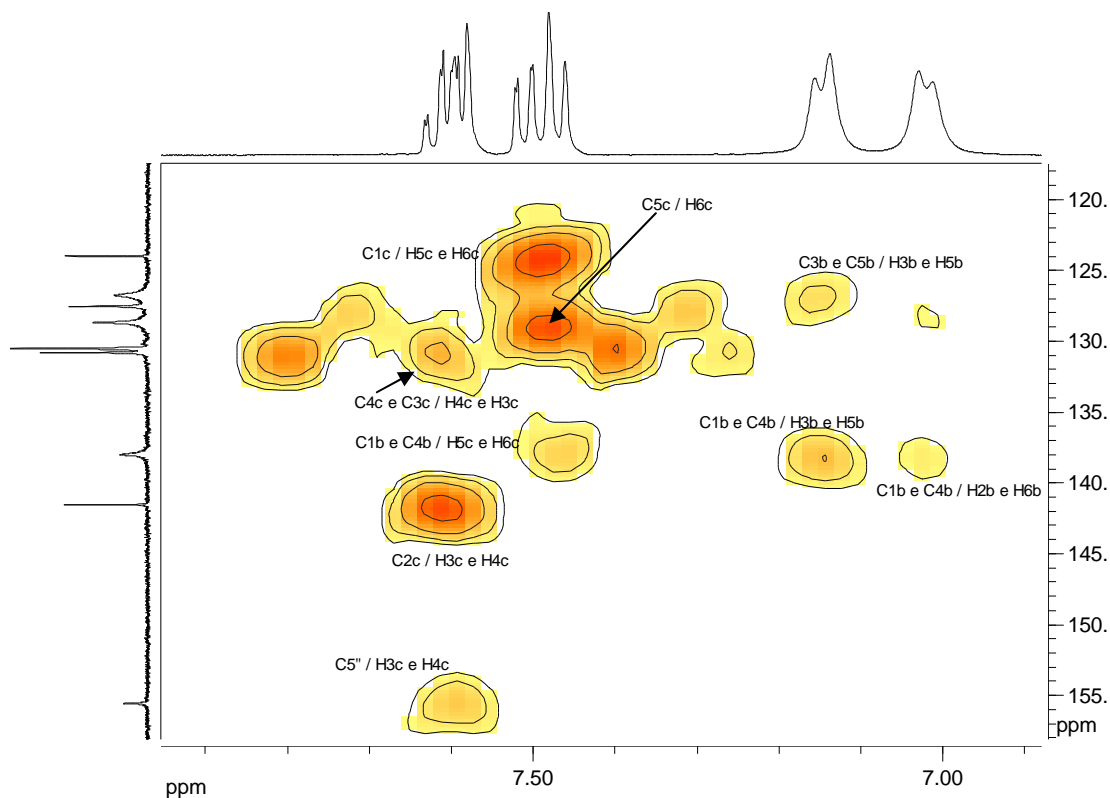
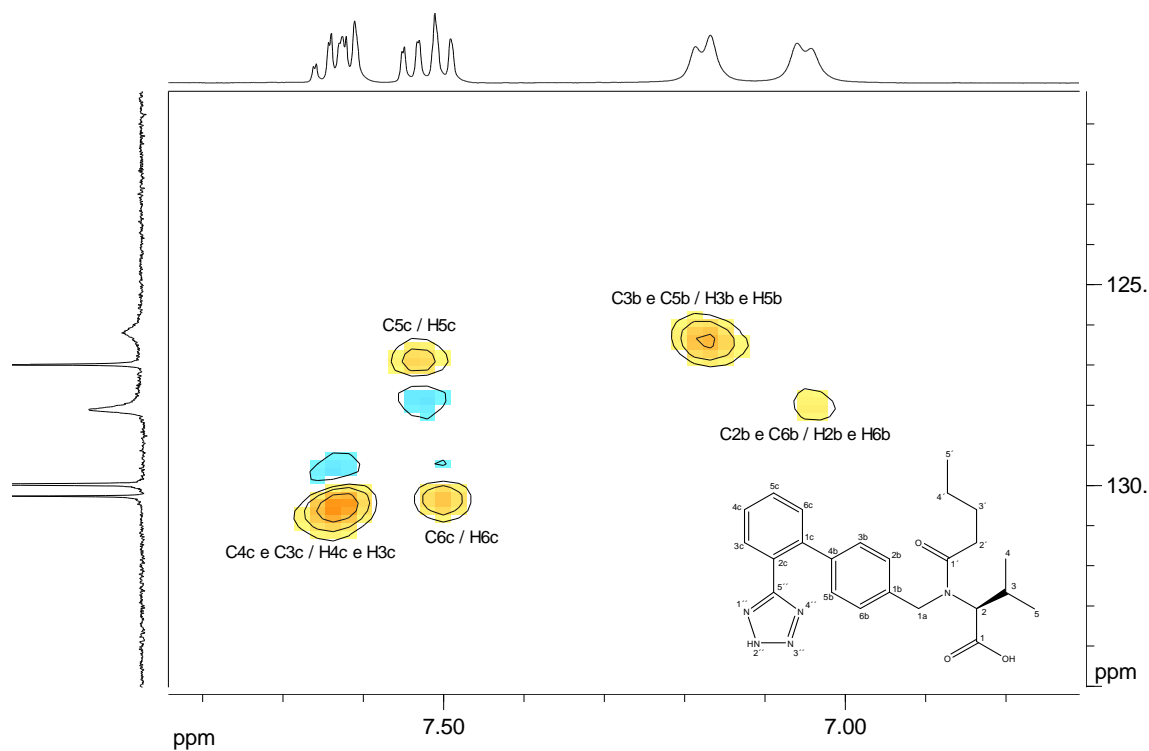
Seção expandida da região entre  $\delta$  0,5 ppm e  $\delta$  4,6 ppm no mapa de contornos HMQC (DEPT 135) do valsartan em DMSO- $d_6$  (400 MHz) a 27°C.

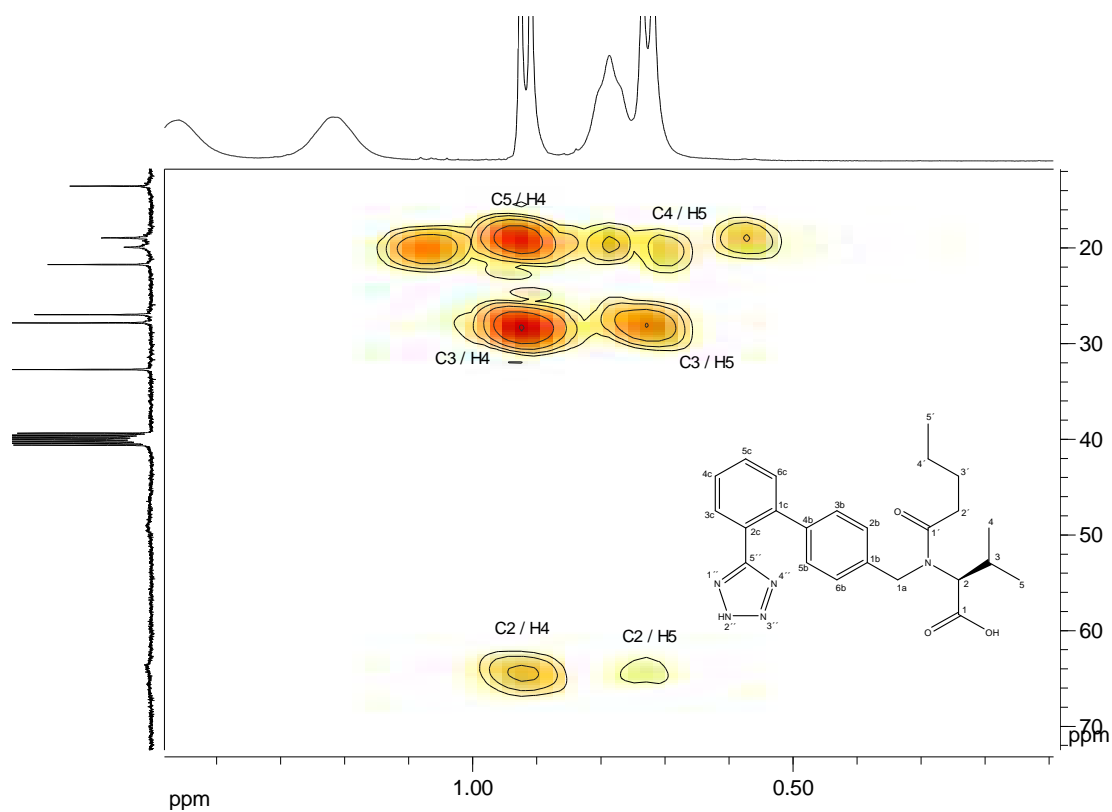


Seção expandida da região entre  $\delta$  0,5 ppm e  $\delta$  4,6 ppm no mapa de contornos HMQC (DEPT 135) do valsartan em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) a  $107^\circ\text{C}$ .



Seção expandida da região entre  $\delta$  6,7 ppm e  $\delta$  7,8 ppm no mapa de contornos HMQC (DEPT 135) do valsartan em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) a  $27^\circ\text{C}$ .

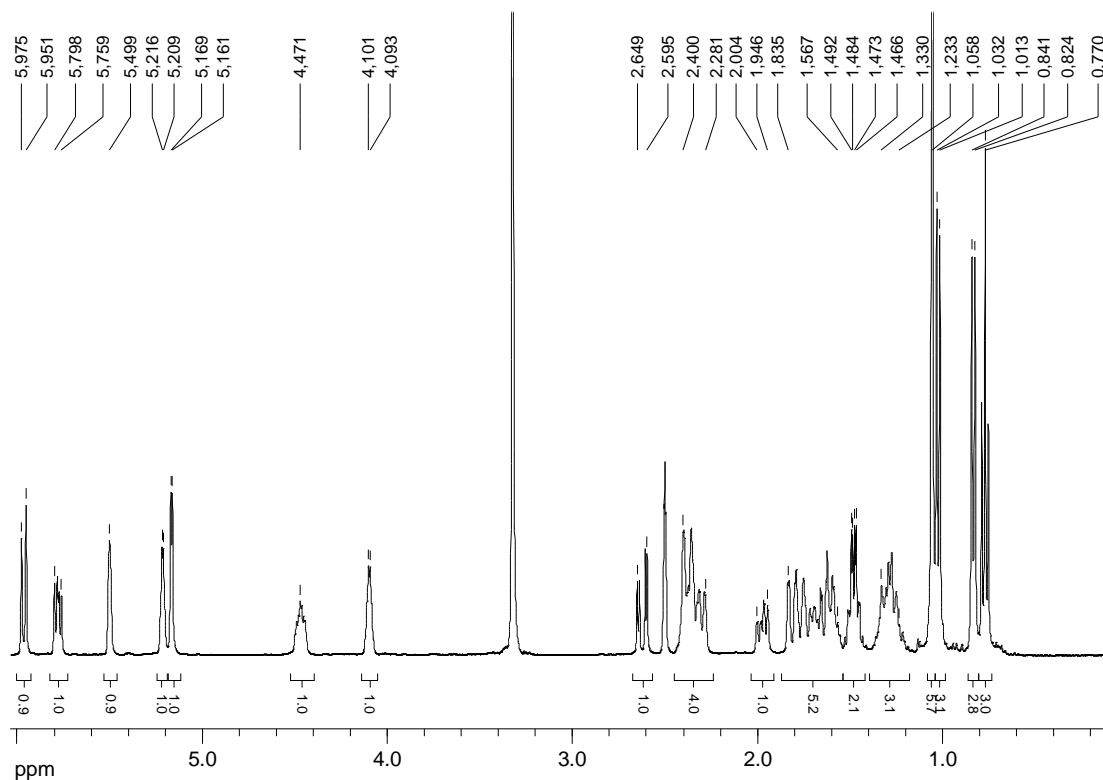




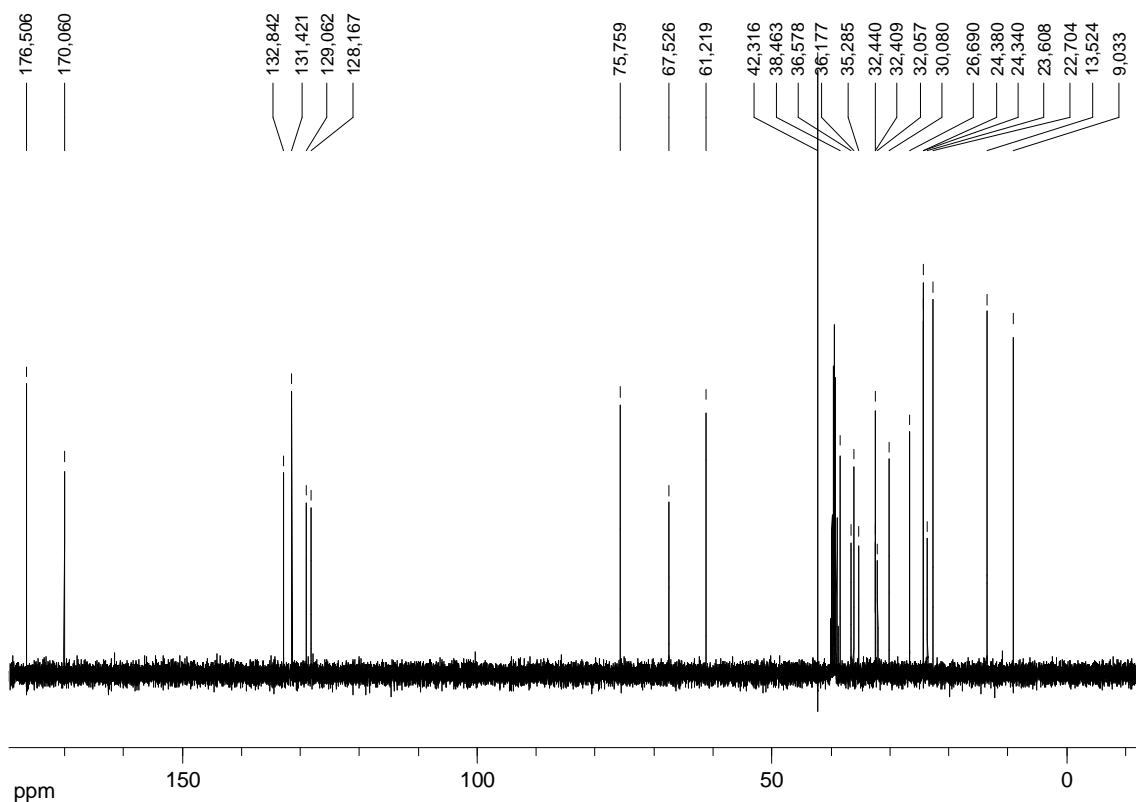
Seção expandida da região entre  $\delta$  0.1 ppm e  $\delta$  1.4 ppm no mapa de contornos HMBC do valsartan em DMSO- $d_6$  (400 MHz) a 107°C.



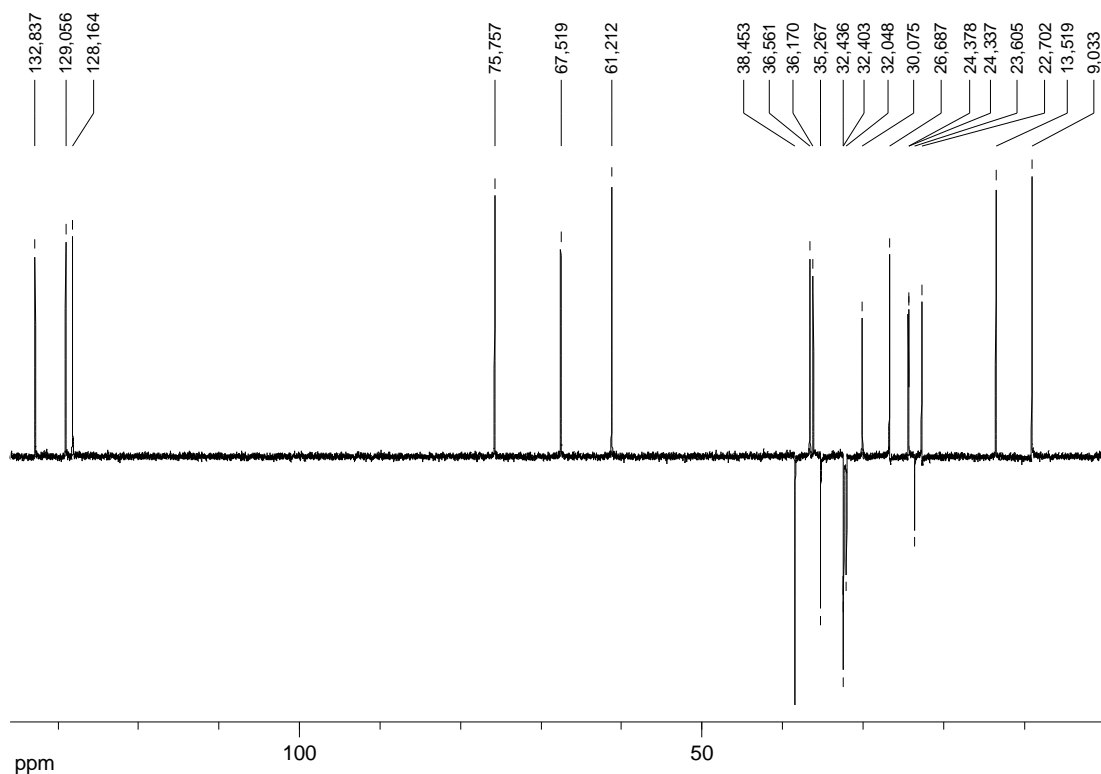




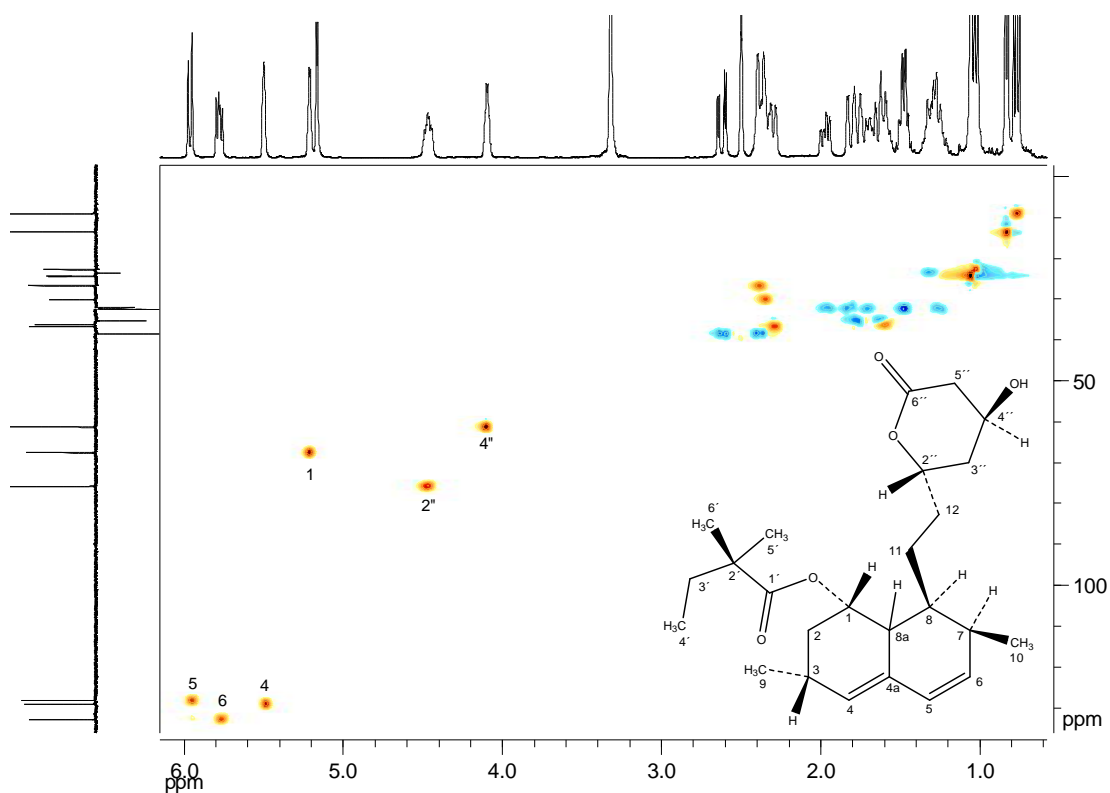
Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a sinvastatina.



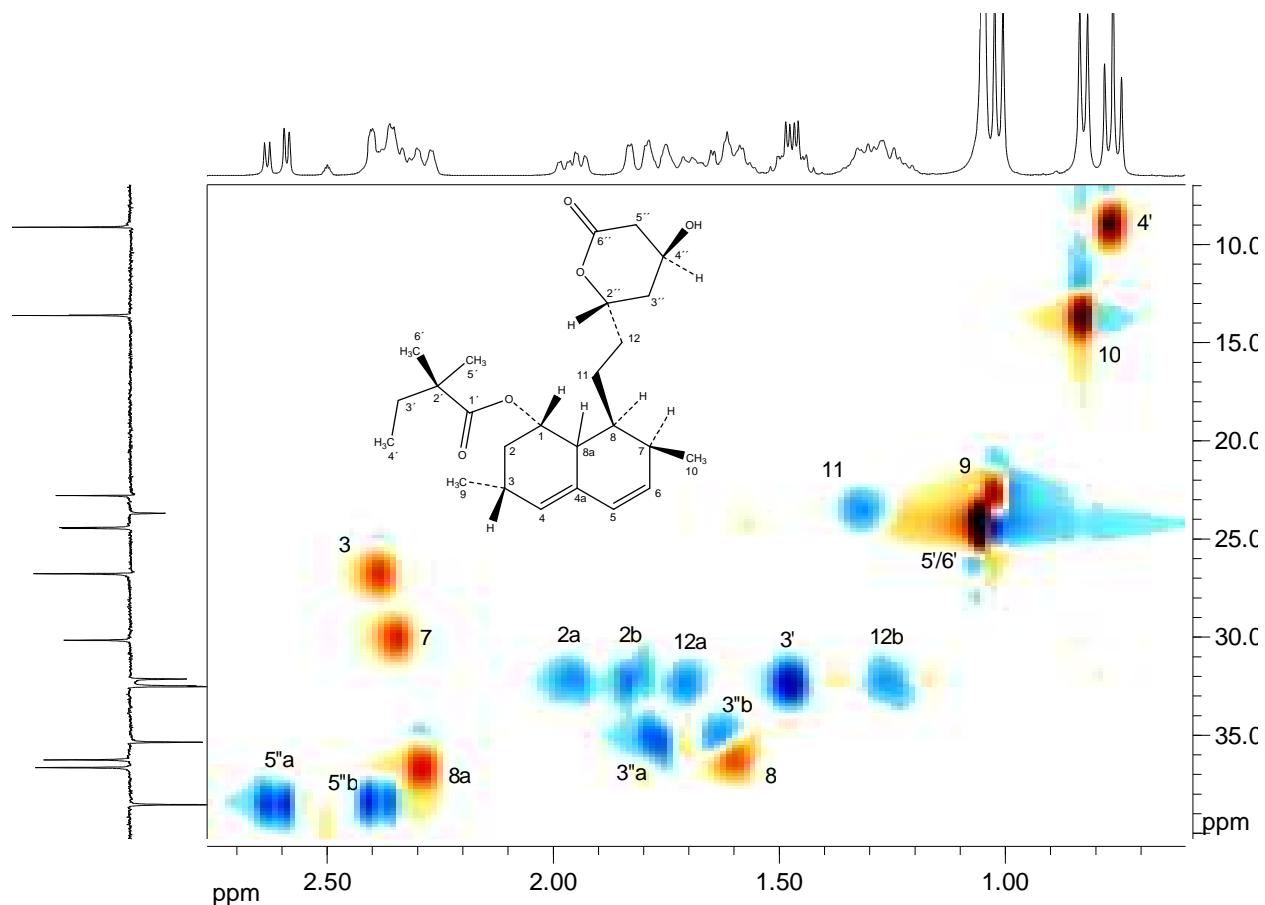
Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a sinvastatina.



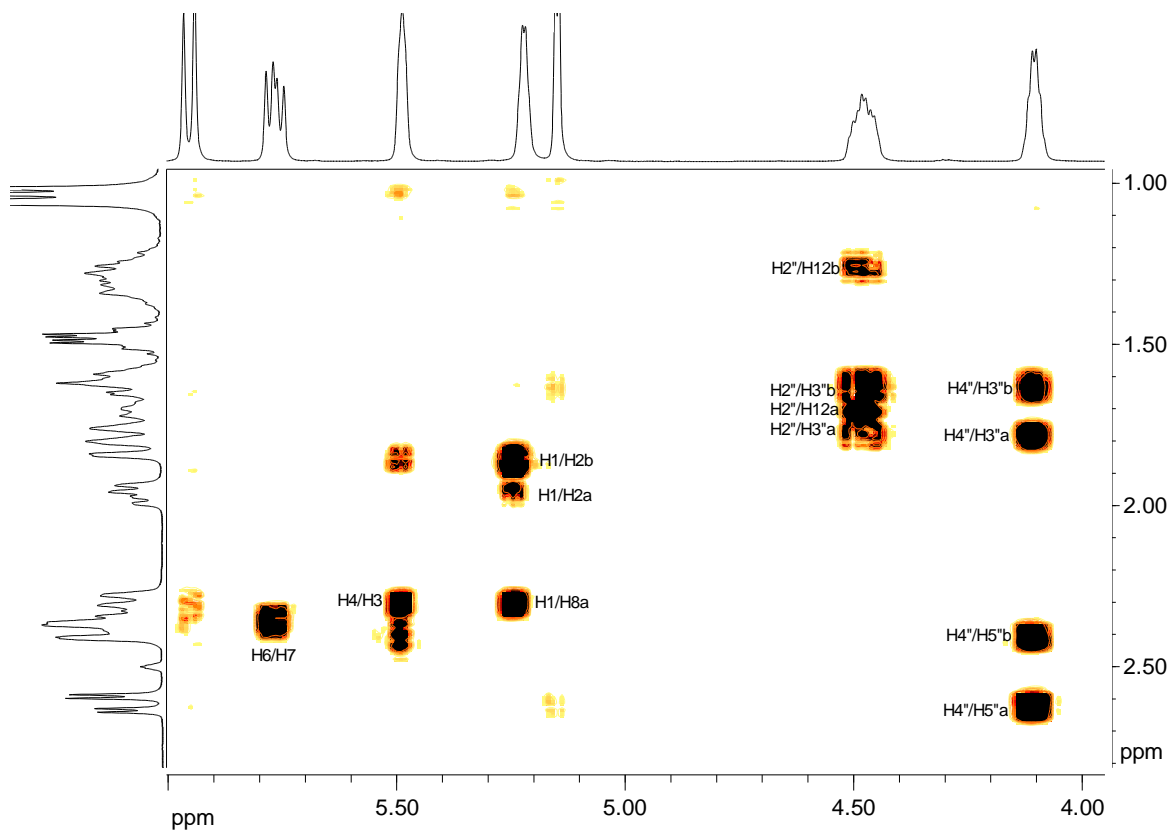
Subespectro de ressonância magnética DEPT 135 em DMSO- $d_6$  (400 MHz) para a sinvastatina.



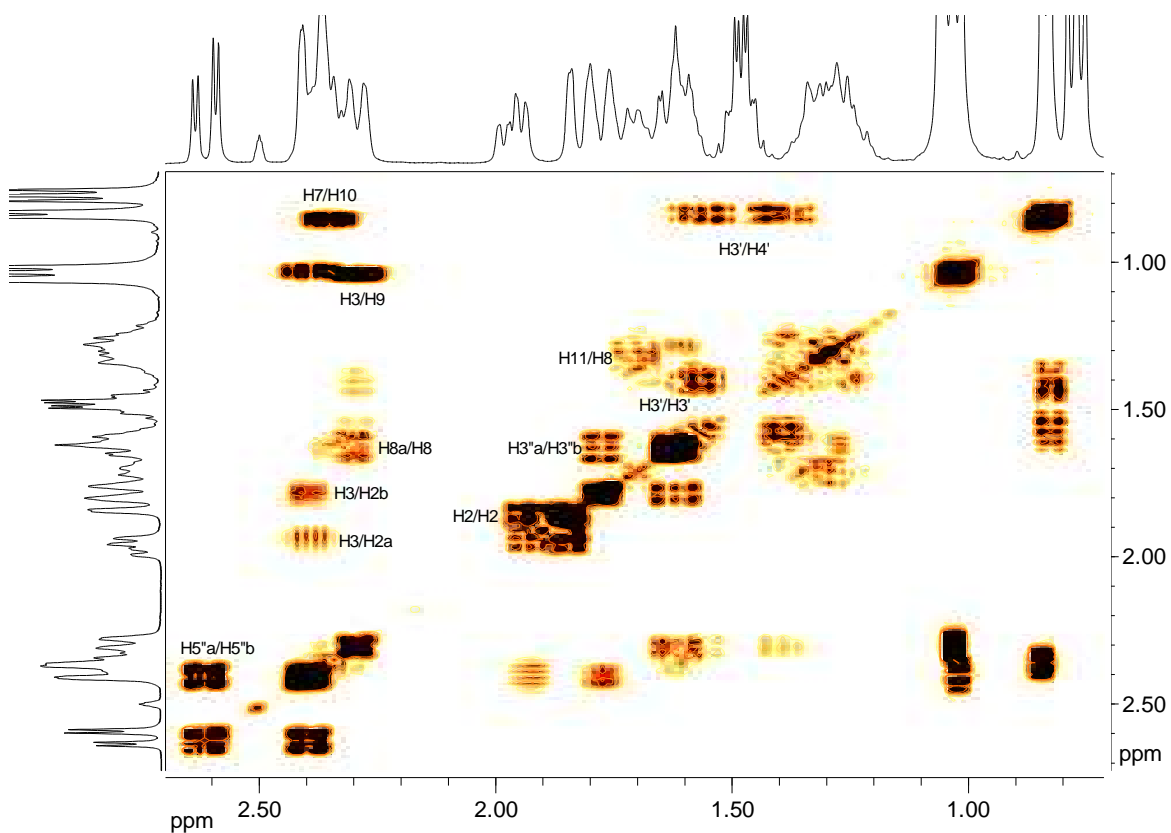
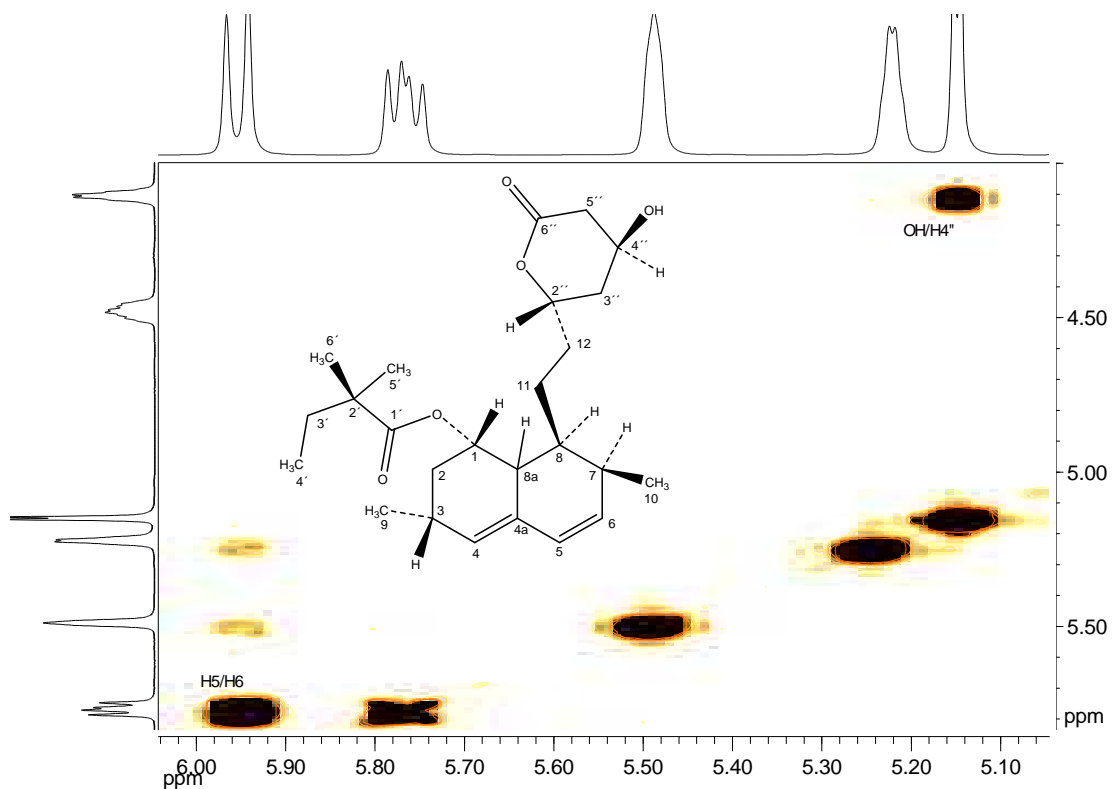
Mapa de contornos HMBC (DEPT 135) da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

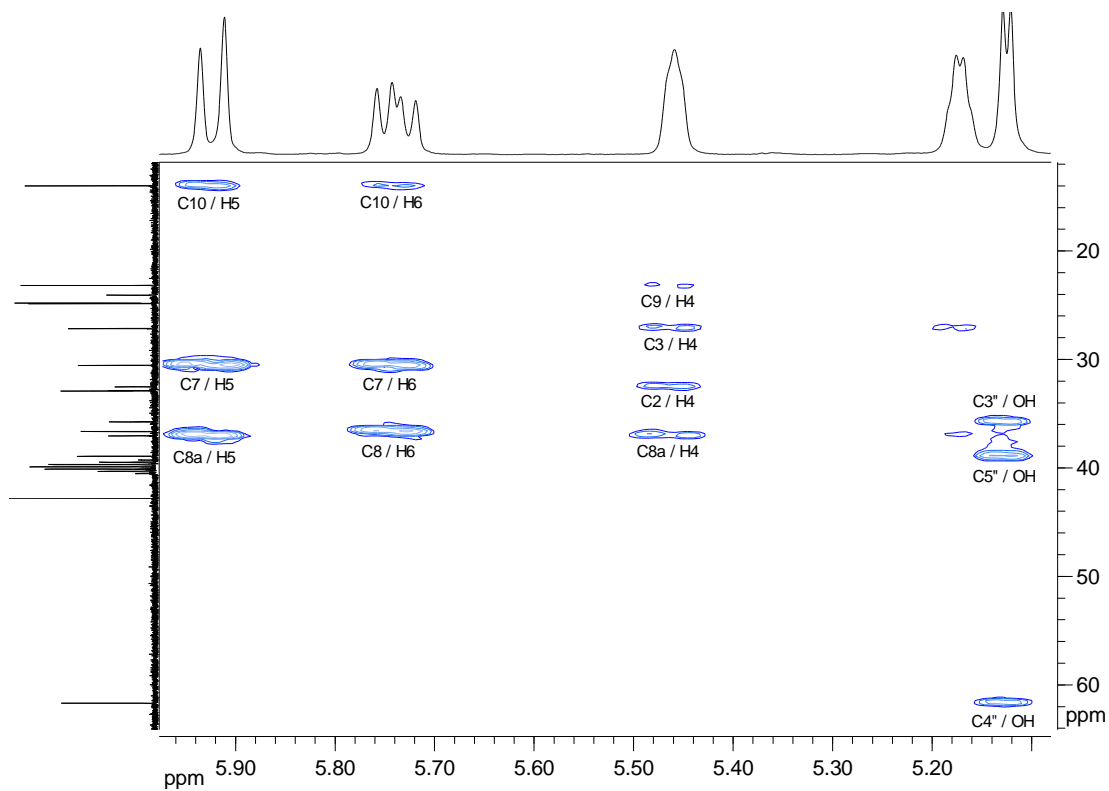


Seção expandida da região entre  $\delta$  0,7 ppm e  $\delta$  2,7 ppm no mapa de contornos HMQC (DEPT 135) da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

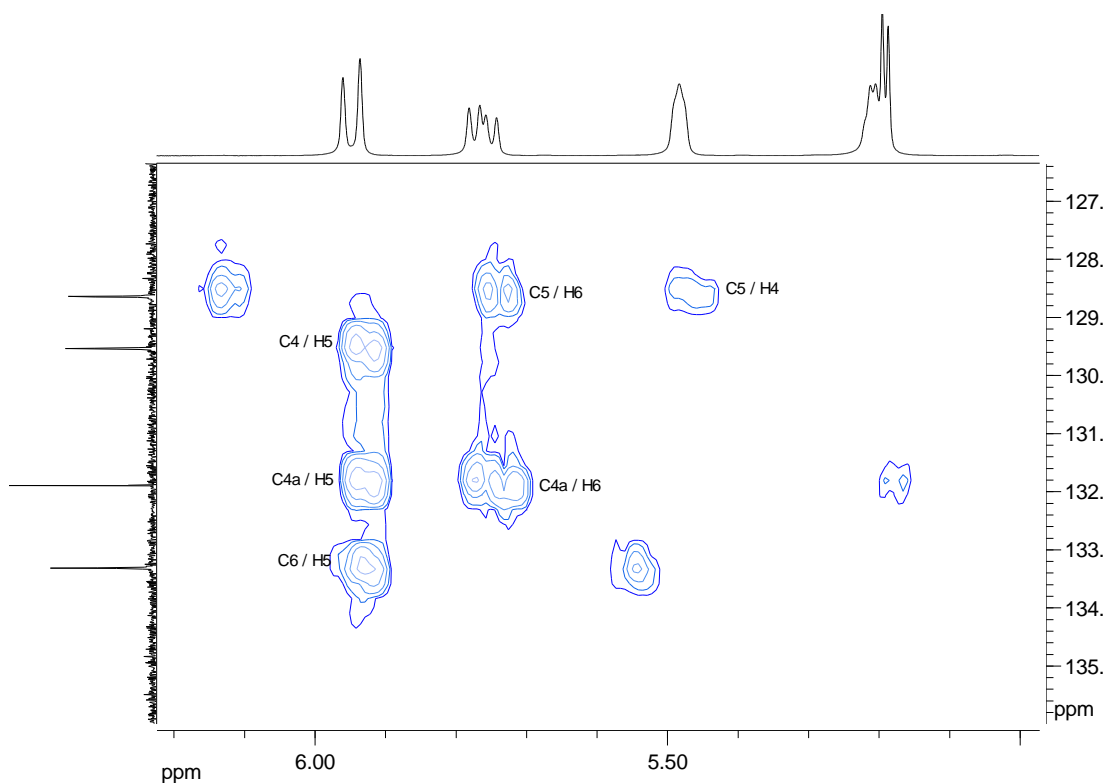


Seção do mapa de contornos COSY para a sinvastatina na região de  $\delta$  4,0-6,0 ppm.

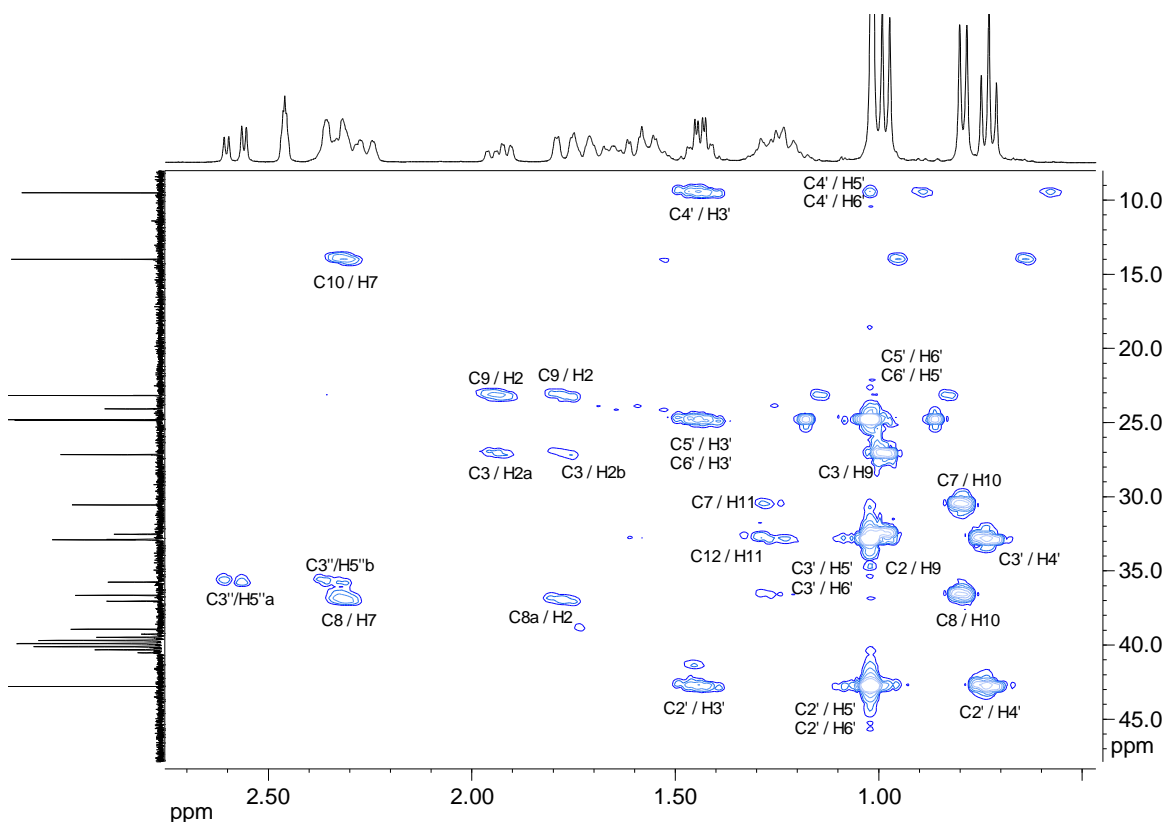




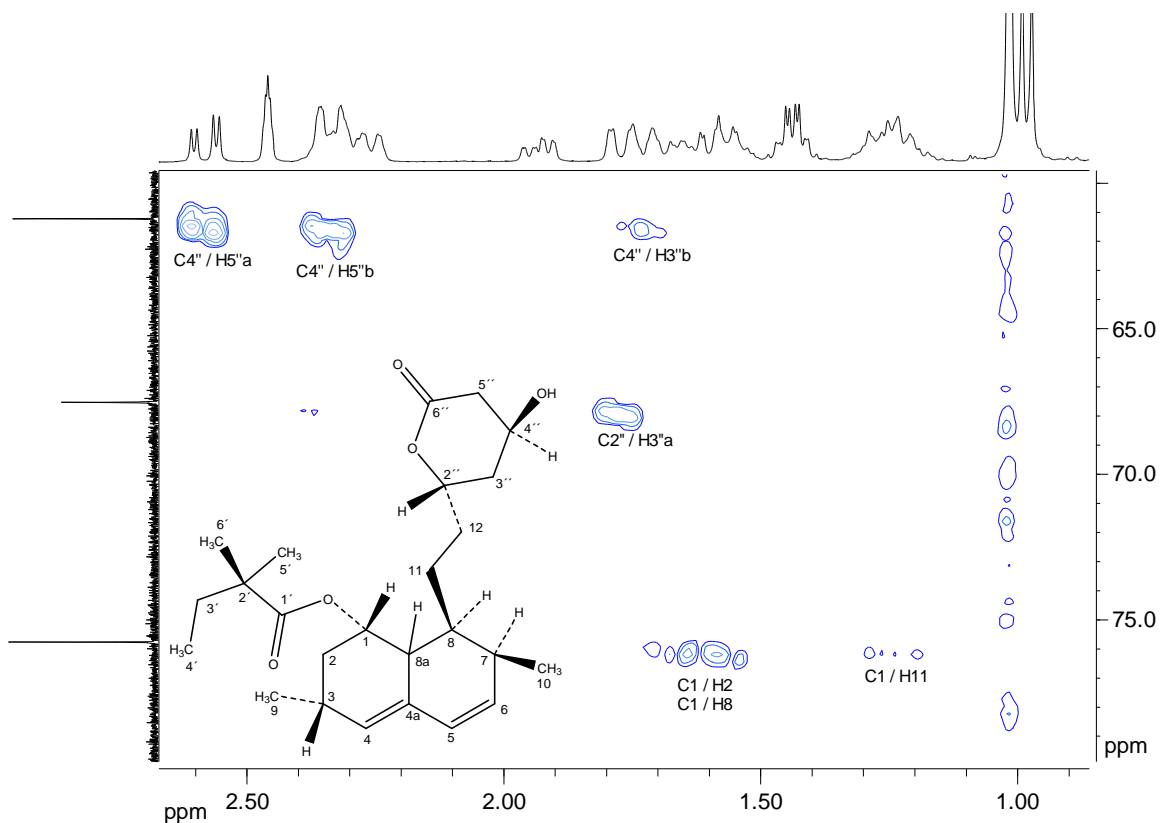
Seção expandida da região entre  $\delta$  5,1 ppm e  $\delta$  6,0 ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).



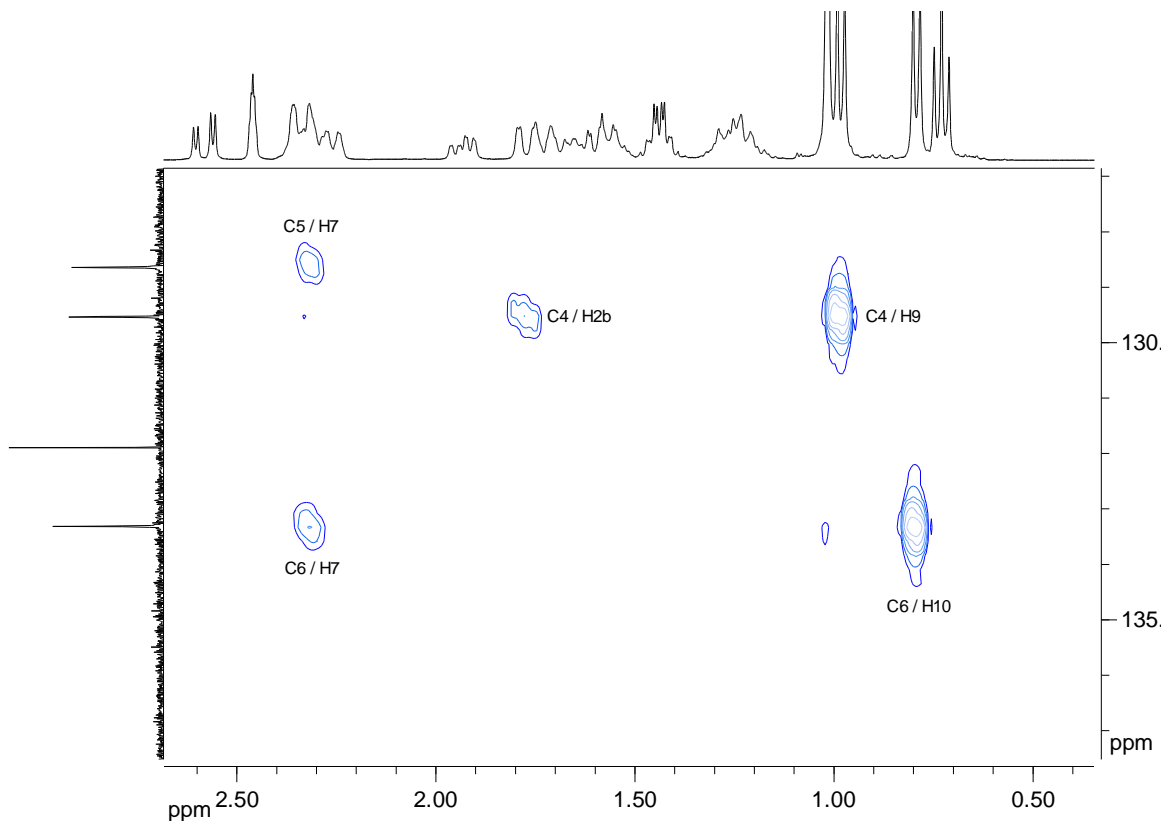
Seção expandida da região entre  $\delta$  5,0 ppm e  $\delta$  6,2 ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).



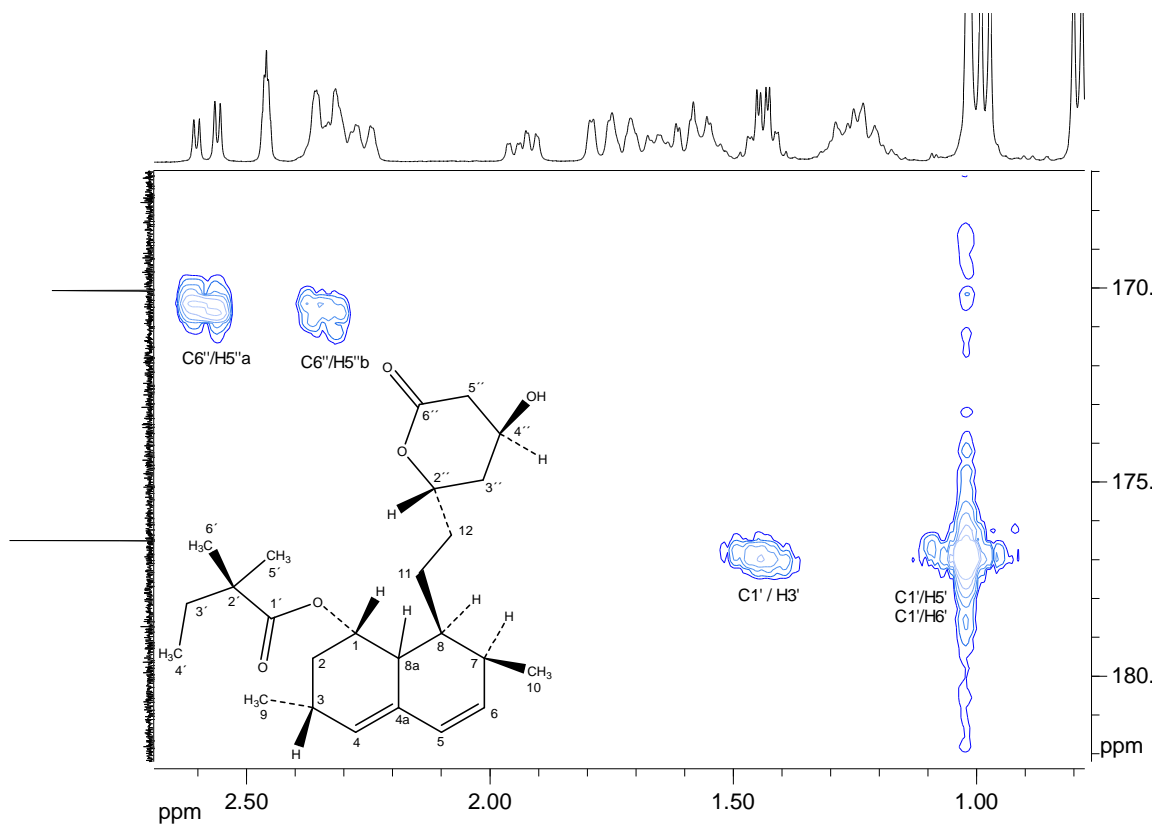
Seção expandida da região entre  $\delta$  0,4 ppm e  $\delta$  2,7ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).



Seção expandida da região entre  $\delta$  0,9 ppm e  $\delta$  2,6 ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

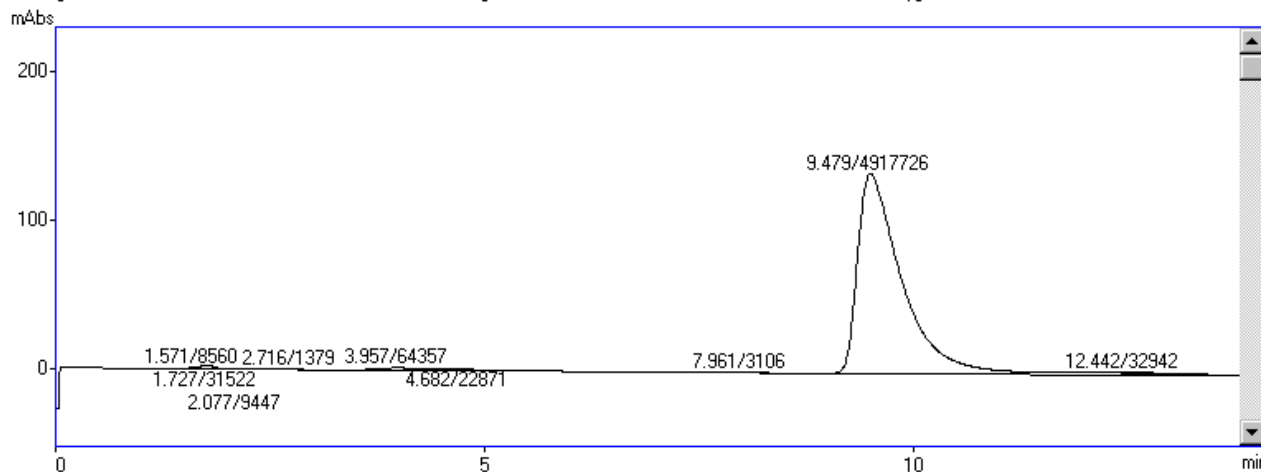
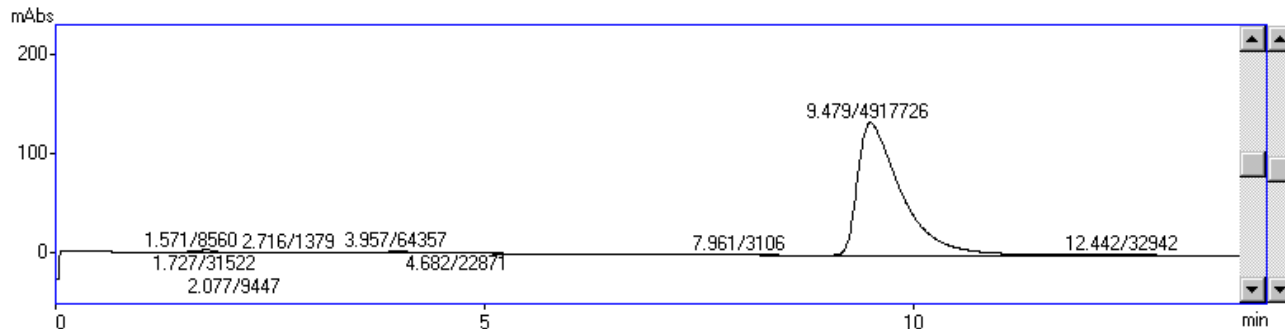


Seção expandida da região entre  $\delta$  0,4 ppm e  $\delta$  2,6 ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).



Seção expandida da região entre  $\delta$  0,8 ppm e  $\delta$  2,6 ppm no mapa de contornos HMBC da sinvastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

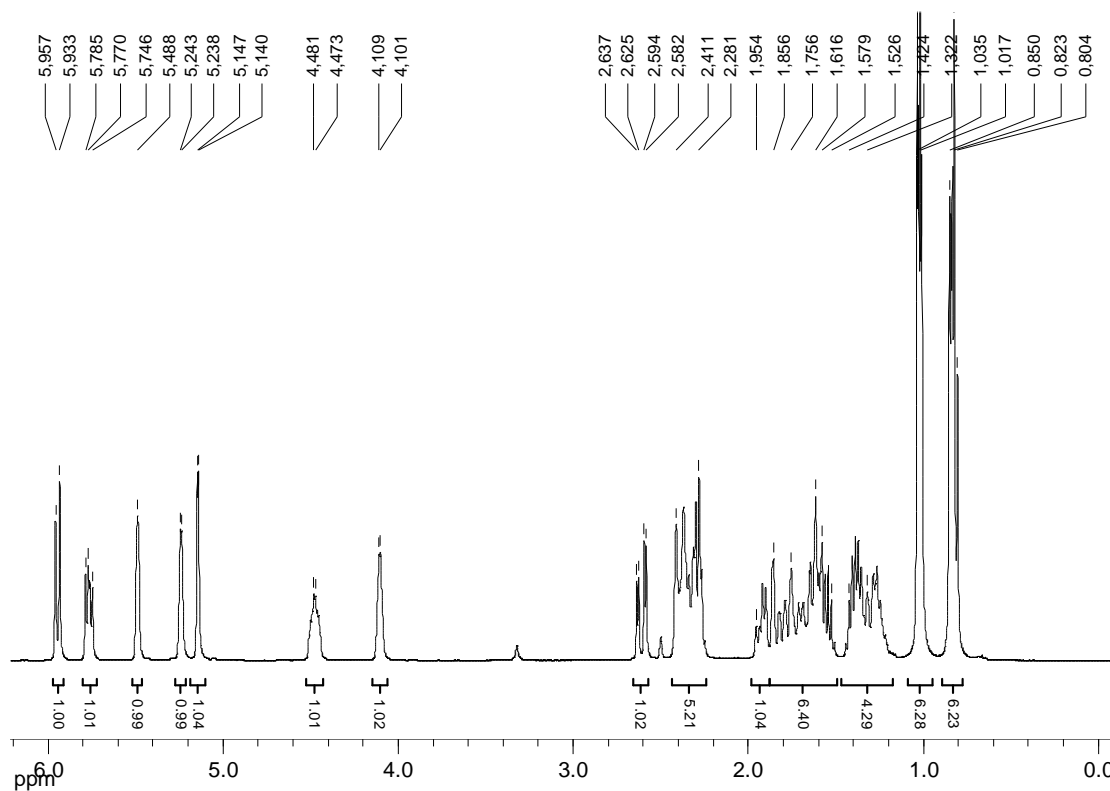
Data: SUT01.D03 Method: SUT01.M03 Ch=1  
Chrom: SUT01.C03 Back chrom: RT: 9.47 Level: 226717 Atten: 8



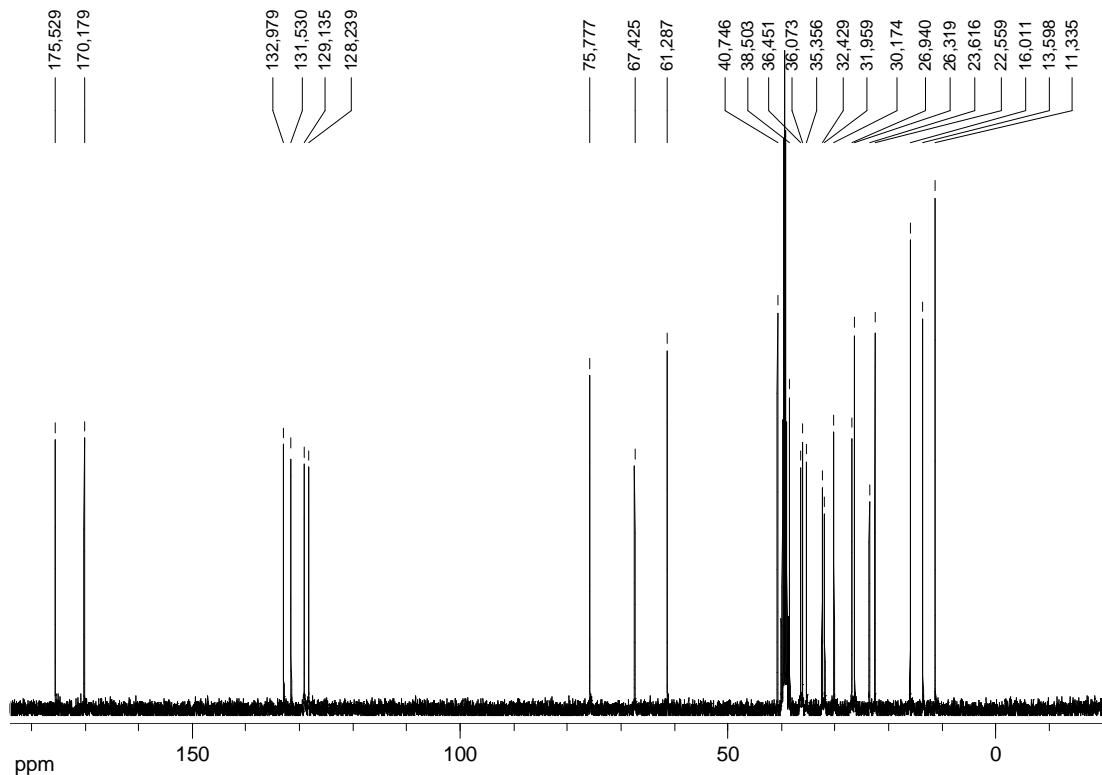
Cromatograma da sinvastatina obtido por HPLC conforme metodologia descrita no item 2.3.2.2 (p.23).



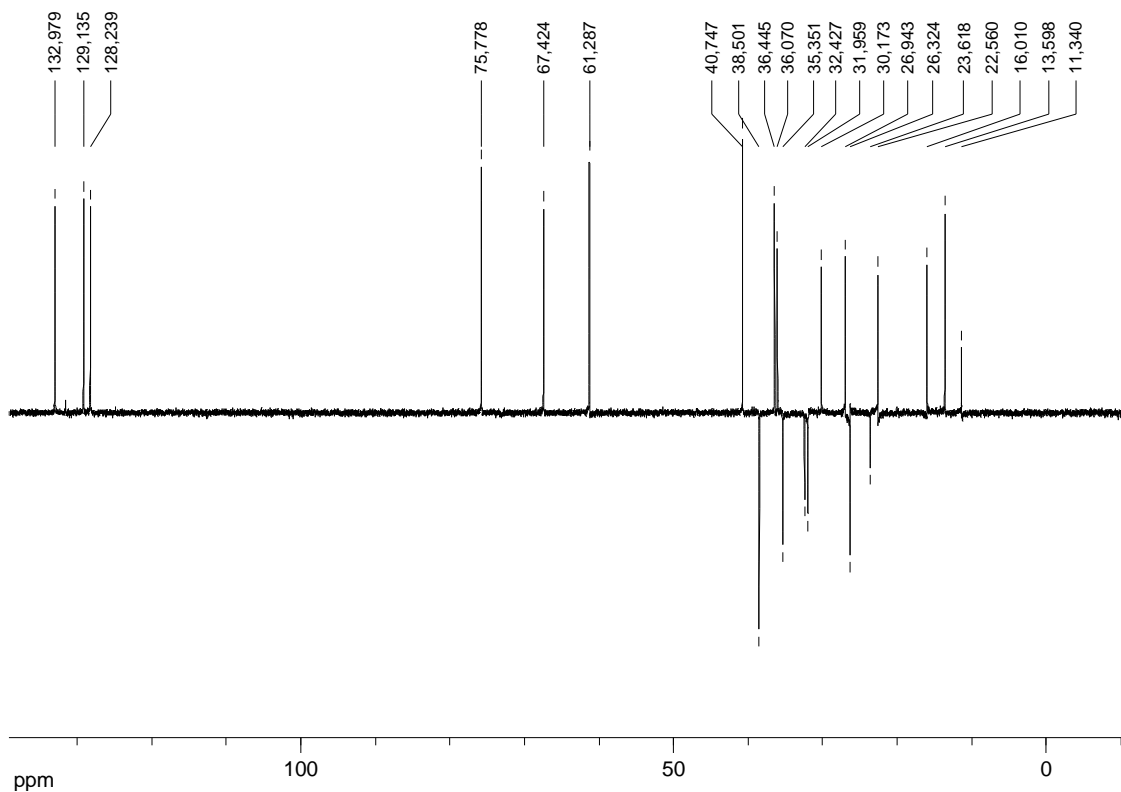




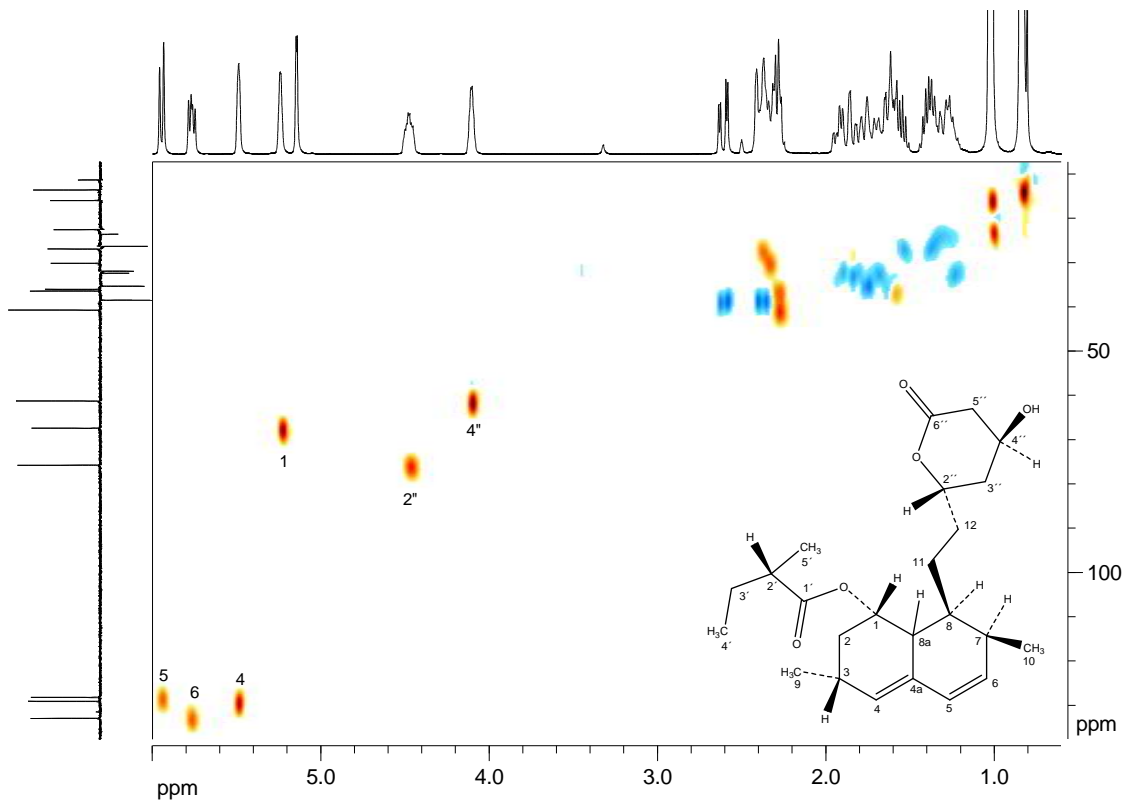
Espectro de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a lovastatina.



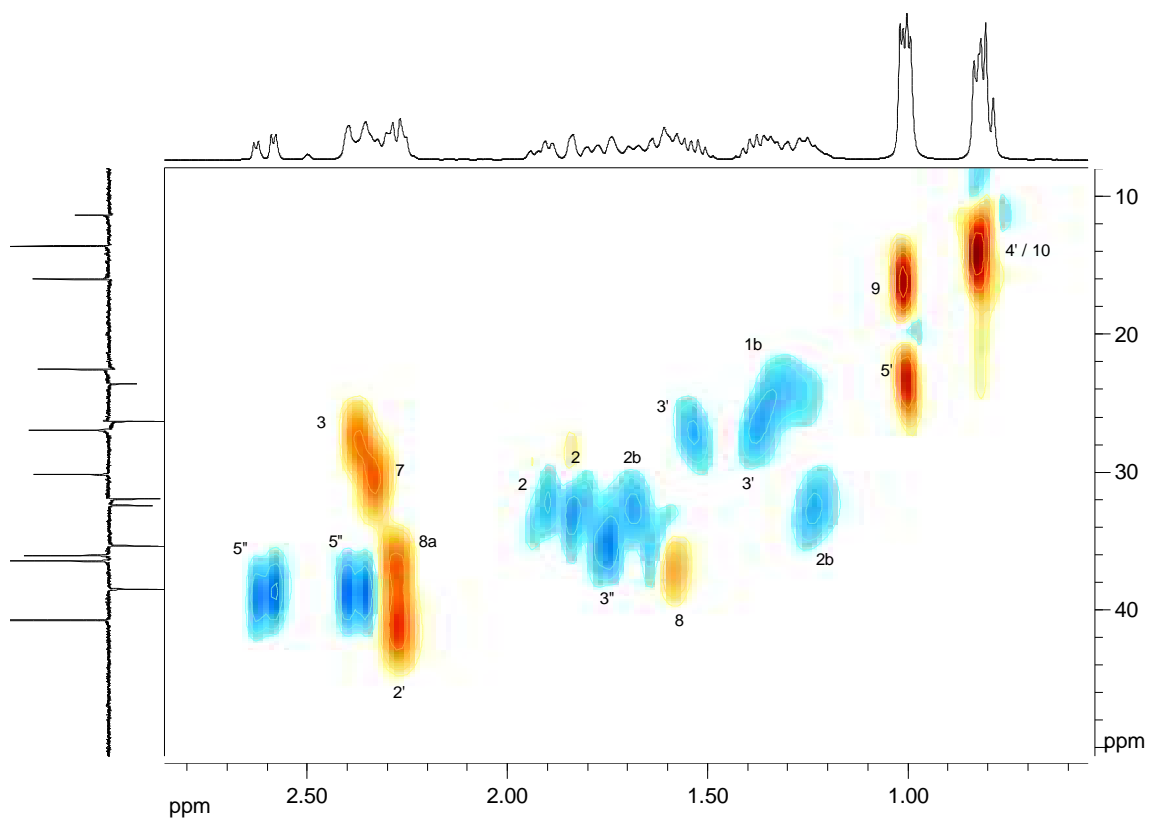
Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz) para a lovastatina.



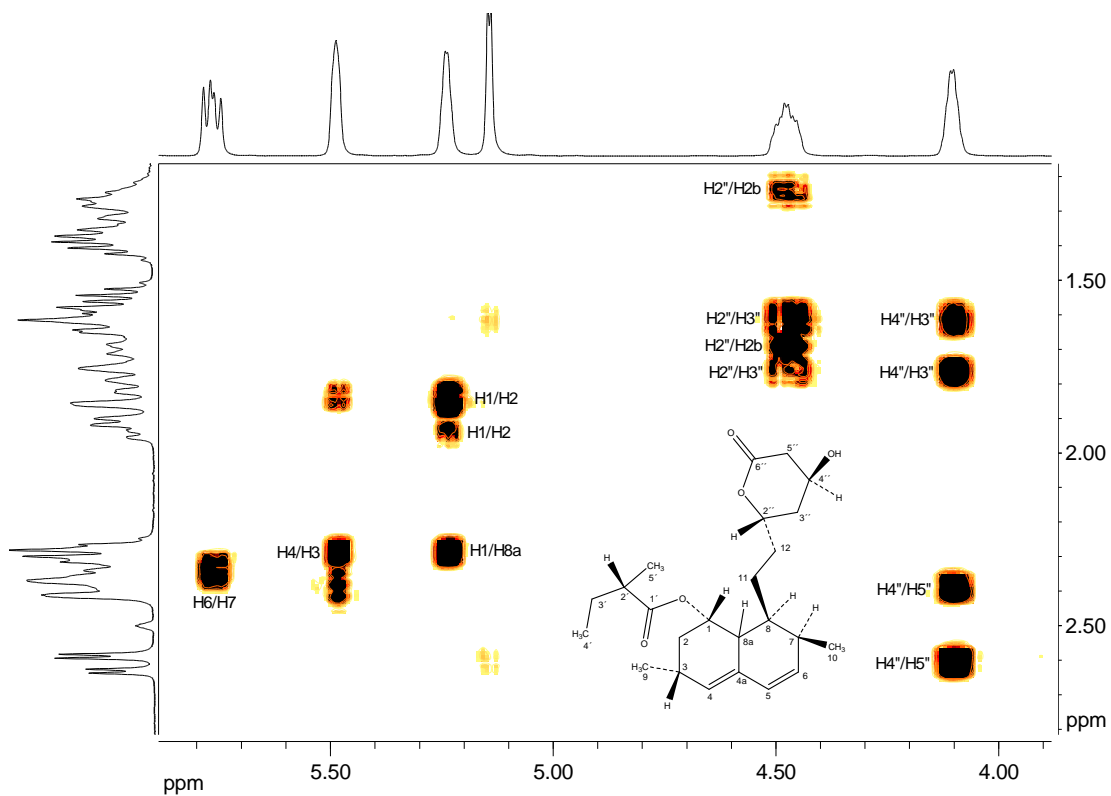
Subespectro de ressonância magnética DEPT 135 em DMSO- $d_6$  (400 MHz) para a lovastatina.



Mapa de contornos HMBC (DEPT 135) da lovastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz) a 27°C.



Seção expandida da região entre  $\delta$  0,5 ppm e  $\delta$  2,8 ppm no mapa de contornos HMQC (DEPT 135) da lovastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).



Seção do mapa de contornos COSY para a lovastatina na região de 3,9-5,9 ppm.

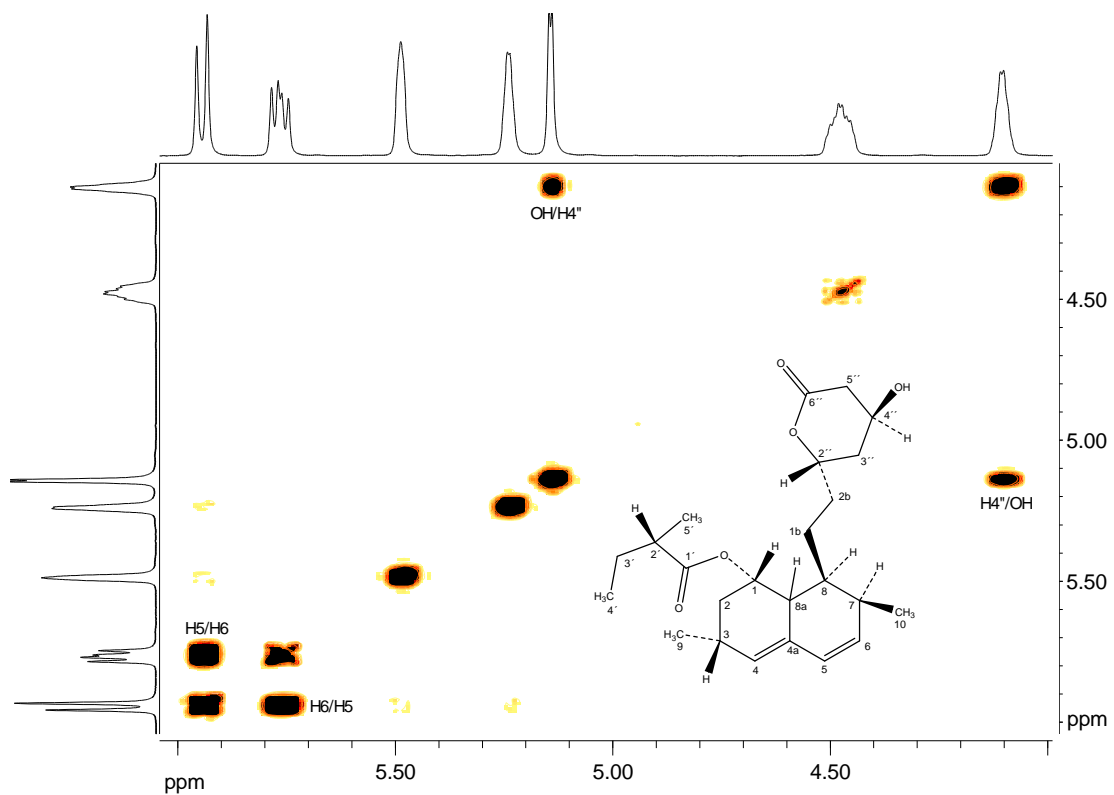


Figura 3.55. Seção do mapa de contornos COSY para a lovastatina na região de 4,0-6,0 ppm.

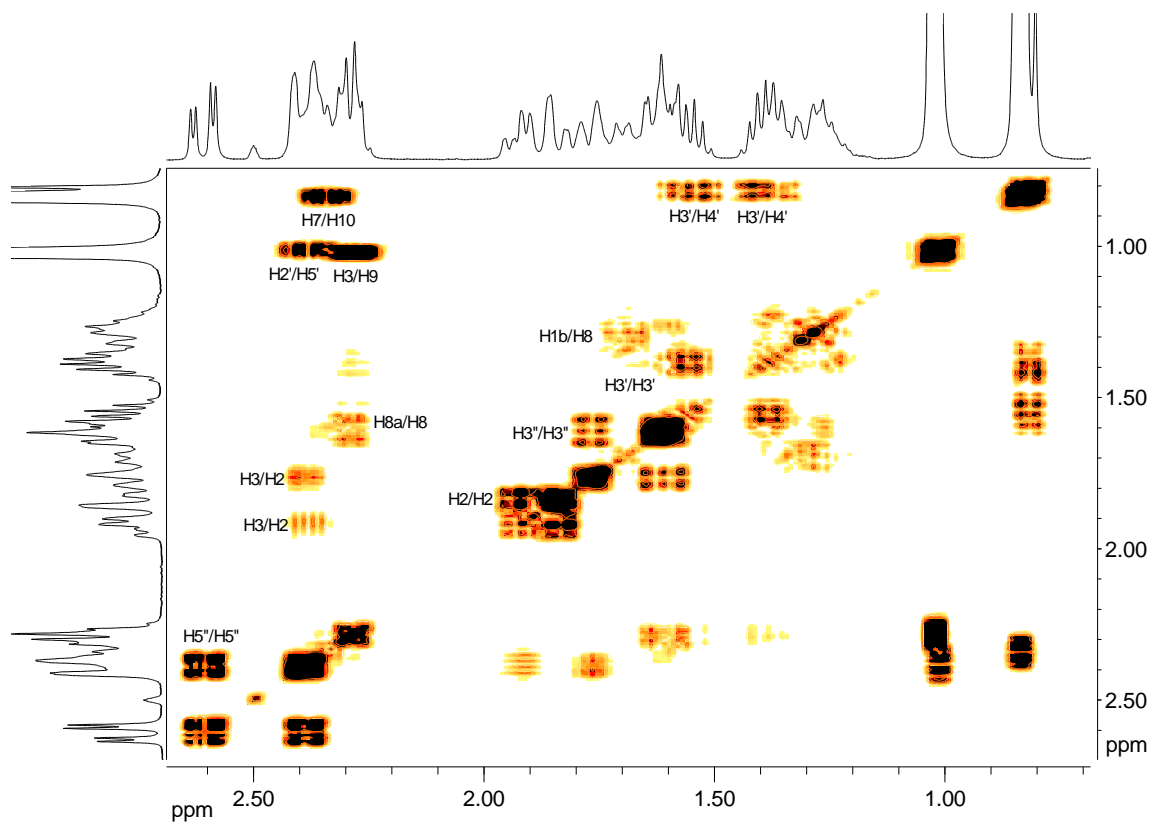


Figura 3.56. Seção do mapa de contornos COSY para a lovastatina na região de 0,7-2,6 ppm.

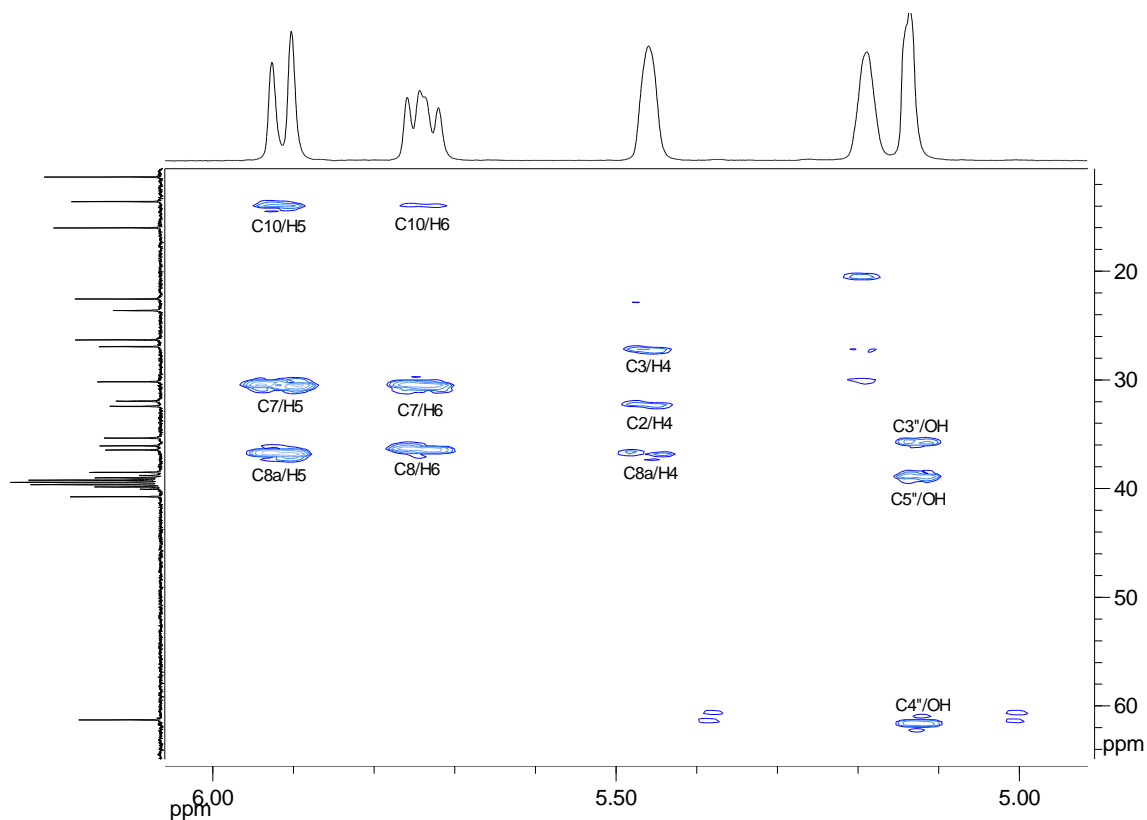


Figura 3.57. Seção expandida da região entre  $\delta$  4.9 ppm e  $\delta$  6.1 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em DMSO-*d*<sub>6</sub> (400 MHz).

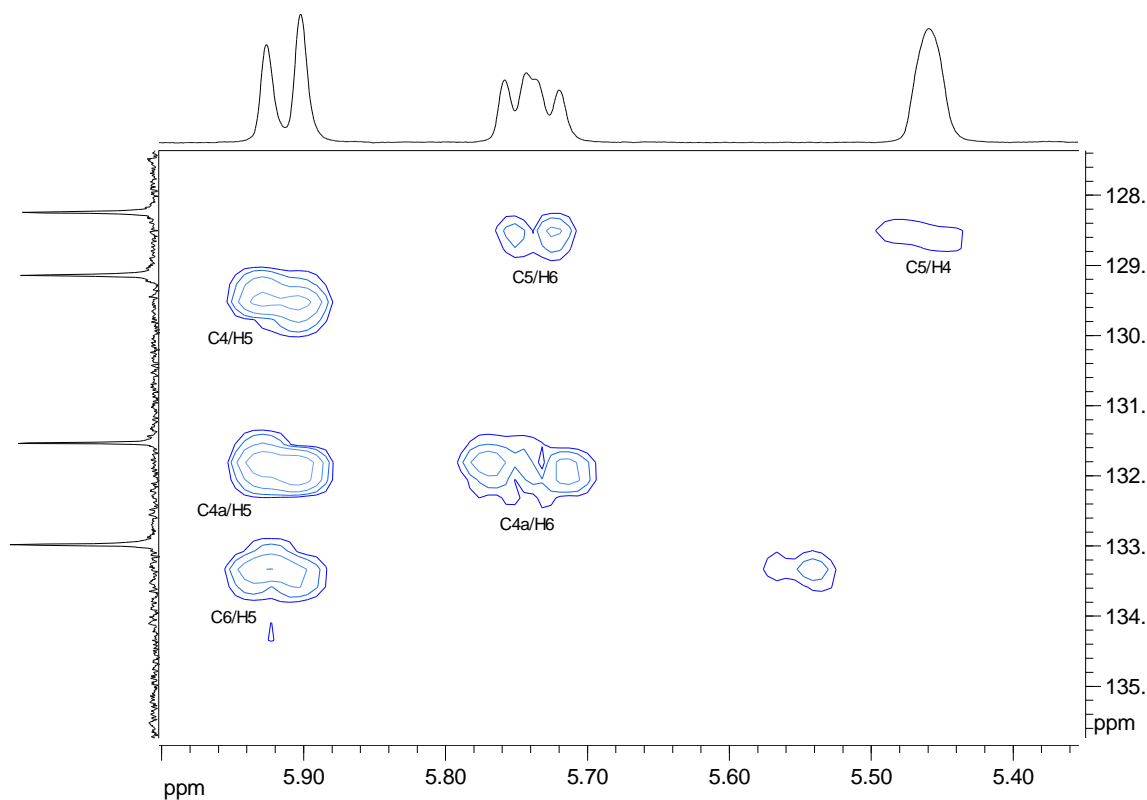


Figura 3.58. Seção expandida da região entre  $\delta$  5,4 ppm e  $\delta$  6,0 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em DMSO-*d*<sub>6</sub> (400 MHz).

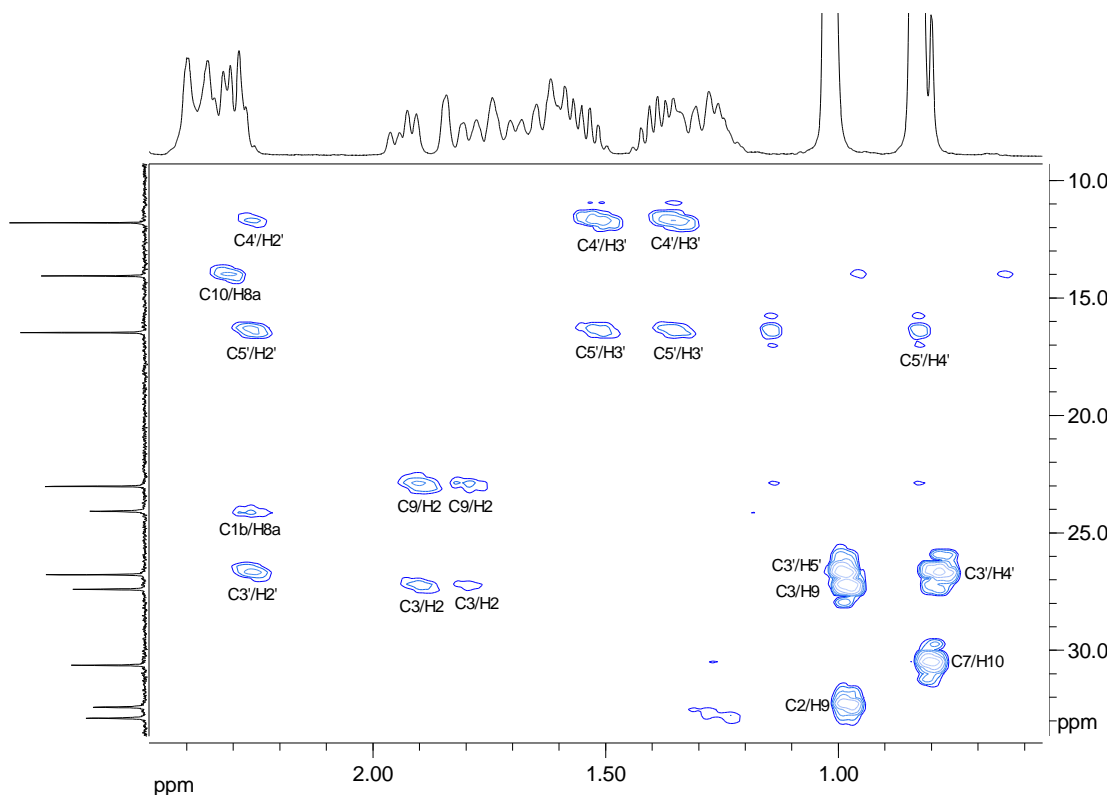


Figura 3.59. Seção expandida da região entre  $\delta$  5,4 ppm e  $\delta$  6,0 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

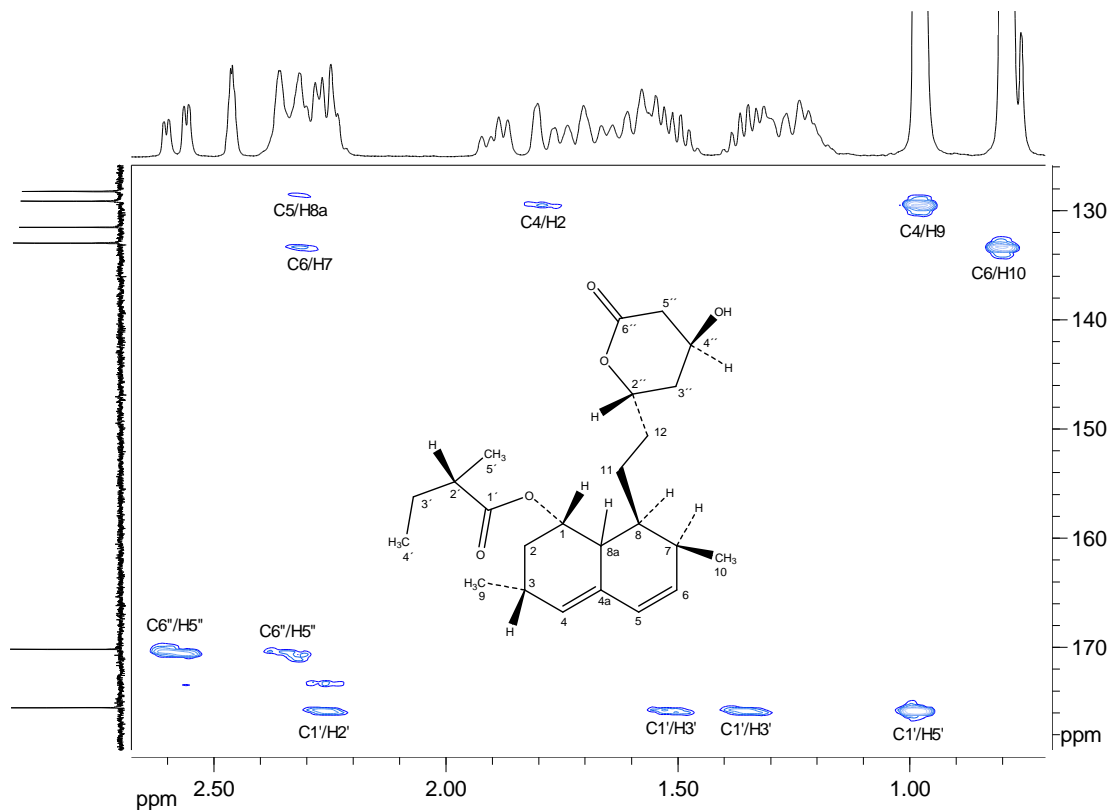


Figura 3.60. Seção expandida da região entre  $\delta$  0,7 ppm e  $\delta$  2,6 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em DMSO- $d_6$  (400 MHz).

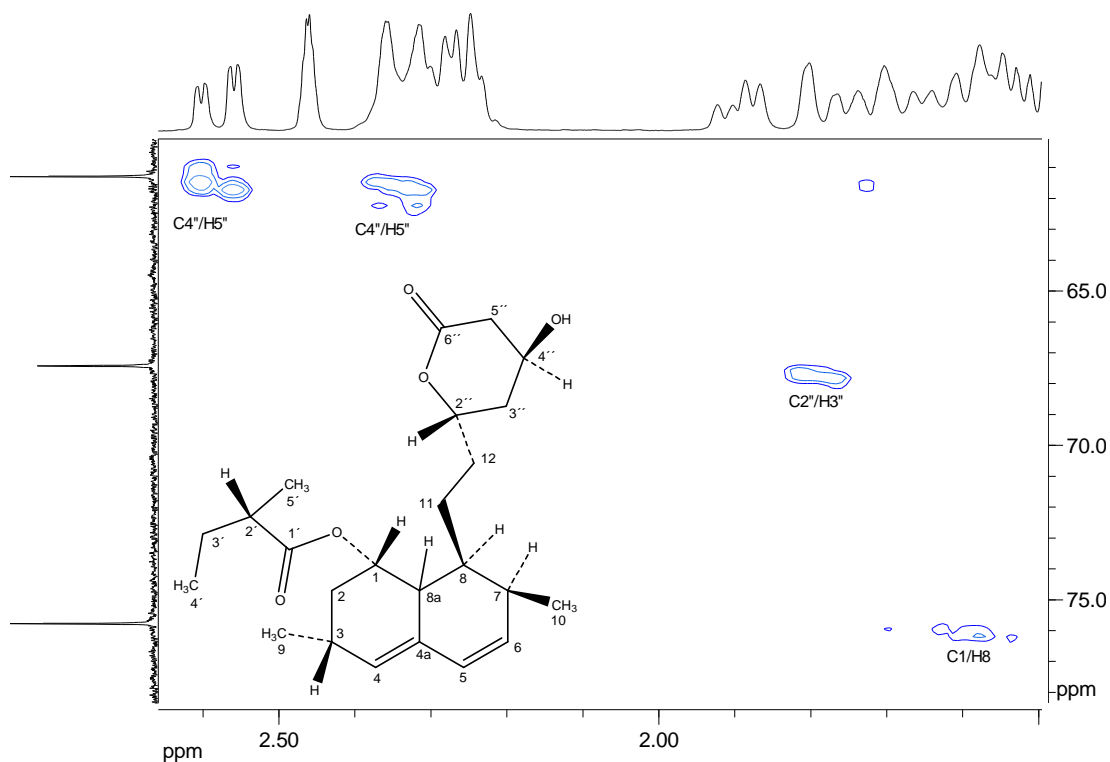


Figura 3.61. Seção expandida da região entre  $\delta$  2,0 ppm e  $\delta$  2,6 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz).

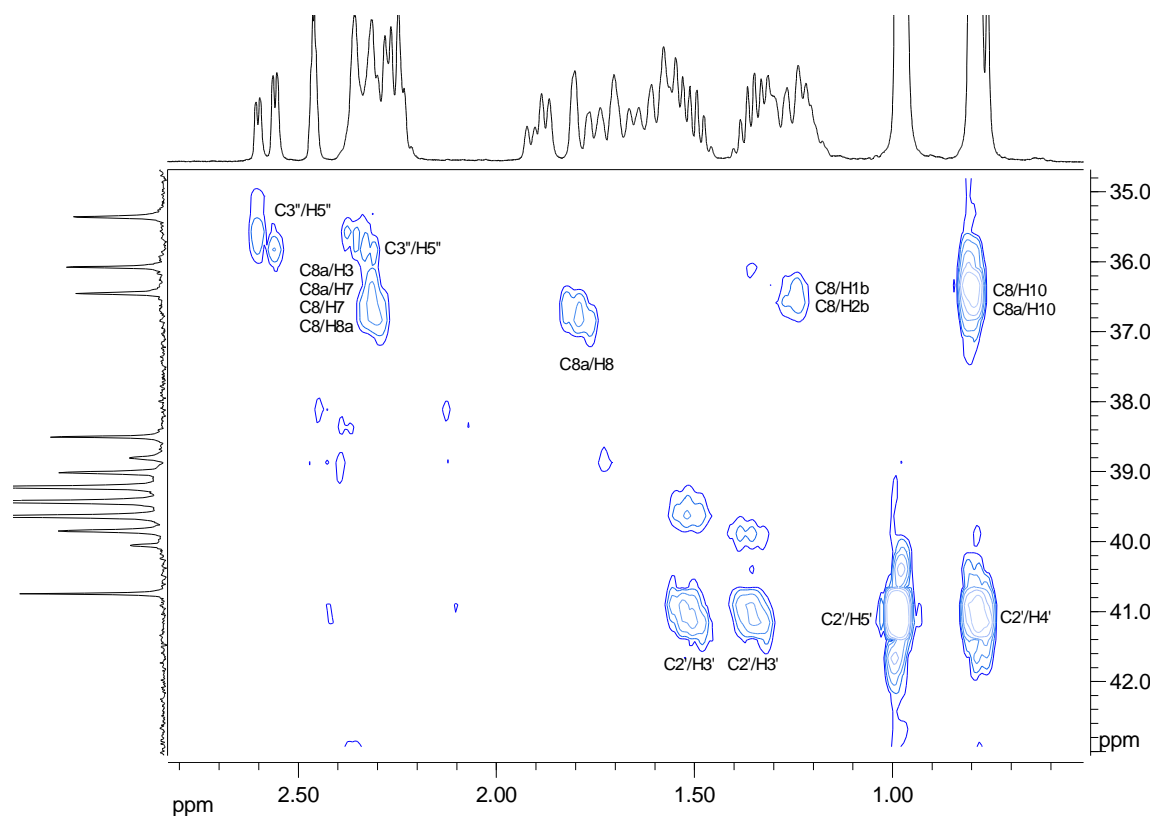


Figura 3.62. Seção expandida da região entre  $\delta$  0,6 ppm e  $\delta$  2,8 ppm no mapa de contornos HMBC da lovastatina em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz).