

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
**Pedro Nicolau Severino Júnior**

Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação in vitro e in vivo de Complexos Contendo  
Hidroclorotiazida,  $\beta$ -ciclodextrina e Colato de sódio.

GUARAPUAVA

2016

**Pedro Nicolau Severino Júnior**

Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação in vitro e in vivo de Complexos Contendo  
Hidroclorotiazida,  $\beta$ -ciclodextrina e Colato de sódio.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira**  
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Sakis Bernardi**

GUARAPUAVA  
2016

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

S498d Severino Júnior, Pedro Nicolau  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro e in vivo de Complexos Contendo Hidroclorotiazida,  $\beta$ -ciclodextrina e Colato de sódio / Pedro Nicolau Severino Júnior. -- Guarapuava, 2015  
xiii, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: Paulo Renato de Oliveira  
Coorientadora: Larissa Sakis Bernardi  
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Rafael Nicolay Pereira

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Hidroclorotiazida. 3. Ciclodextrina. 4. Validação. 5. Sais biliares. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO, pela oportunidade oferecida e a CAPES pela bolsa concedida;

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo Renato de Oliveira, primeiramente pela oportunidade oferecida, e também por toda dedicação e companheirismo nestes dois anos de trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Sakis Bernardi, pela co-orientação, amizade e apoio;

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva pela disponibilização do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFSC) e equipamentos;

À doutoranda Cassiana Mendes, pela disponibilidade e imprescindível ajuda na realização deste trabalho;

Às farmacêuticas Aline Buttchevitz e Ana Carolina Miranda pela ajuda prestada;

Aos colegas de laboratório em especial à Carolina Martins Abreu e Lays Ramos pela inestimável ajuda prestada nos experimentos;

À minha família, pois um dos grandes motivos de eu me encontrar onde estou hoje é devido à seu apoio incondicional;

À minha companheira de vida, Samira Franqui Fanti, por me apoiar em cada passo e não me deixar desanimar nunca.

Ao Universo, por ter conspirado ao meu favor em mais esta empreitada.

## RESUMO

A Hidroclorotiazida (HCTZ) é um fármaco pertencente a categoria dos diuréticos tiazídicos. É um composto heterocíclico que possui fórmula  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ , sendo formado por dois grupos sulfonamida. Conhecida a mais de meio século, é um dos fármacos na escolha para o tratamento de hipertensão arterial, tendo seu mecanismo de ação baseado no aumento da excreção renal de sódio. Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS), a HCTZ se enquadra na categoria IV, ou seja, possui baixa solubilidade e baixa permeabilidade, tendo biodisponibilidade de aproximadamente 65%. Através da complexação da HCTZ com o oligômero cíclico  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e adição do sal biliar colato de sódio (COL), objetivou-se a obtenção de um sistema com melhores características de solubilidade e permeabilidade para o fármaco. Também foi desenvolvida e validada uma nova metodologia para identificação da HCTZ e seus produtos de degradação 4-amino, 6-cloro dissulfonamida (DSA) e clorotiazida (CTZ) através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto. Nos ensaios de fotoestabilidade foi verificado que a complexação melhorou a estabilidade à luz do fármaco. Em relação a avaliação da dissolução *in-vitro* (fluido gástrico simulado, pH 1,2) o perfil de liberação da HCTZ mostrou-se acentuadamente melhor para a formulação HCTZ: $\beta$ CD:COL, o que é um indicativo de uma possível maior quantidade do fármaco disponível no lumen intestinal, e conseqüente melhora de seu efeito terapêutico. O ensaio *in-vivo* demonstrou aumento no volume urinário e maior excreção eletrolítica nos grupos aos quais administraram-se o complexo de inclusão contendo o colato de sódio. Pode-se então concluir que a complexação da HCTZ é um grande passo na melhoria de seu efeito terapêutico.

## ABSTRACT

Hydrochlorothiazide (HCTZ) is a drug that belongs to the class of thiazide diuretics. It is a heterocyclic compound having the formula  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ , being formed by two sulfonamide groups. Known for more than half century, it is one of the drugs of choice when treating high blood pressure and its mechanism of action is based on increased renal sodium excretion. According to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), Hydrochlorothiazide belongs to the IV class, ie very low solubility and permeability, and its bioavailability around 65%. The aim of this study was to improve these aspects of Hydrochlorothiazide by complexation with the cyclic oligomer  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) and the bile salt hydrated sodium cholate (HCOL). Also a new HPLC method was developed and validated for the identification of HCTZ and its degradation products 4-amino-6-chloro disulfonamide (DSA) and chlorothiazide (CTZ). The method proved to be specific, linear, accurate, precise and robust. In the *in-vitro* dissolution test (simulated gastric fluid, pH 1.2) the release profile of the HCTZ was improved for the formulation containing HCTZ:  $\beta$ CD: COL. On the photostability assays it was verified that the complexation improved the stability of the drug against light. The *in-vivo* assays showed an increase on the urinary volume and the electrolytes excretion on the groups that was administrated the inclusion complex containing sodium cholate. According to the data presented, the complexes containing cholate achieved the best dissolution results, which may indicate a greater amount of drug in the intestinal lumen and consequent improvement of its therapeutic effect. It can be concluded that the complexation of hydrochlorothiazide represents an improvement of its therapeutic effect.

Keywords: Hydrochlorothiazide, Cyclodextrins, Validation, Bile Salts.

## LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Relação do SNC no controle da pressão arterial .....	14
Figura 2: Mecanismos patológicos relacionados à ingestão de sódio .....	15
Figura 3: Mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos .....	17
Figura 4: Estrutura química da hidroclorotiazida .....	20
Figura 5: Via de síntese da hidroclorotiazida .....	20
Figura 6: Aspectos conformacionais das ciclodextrinas .....	22
Figura 7: Equação representativa da formação do complexo de inclusão entre fármaco e CD na proporção molar 1:1 .....	23
Figura 8: Cromatogramas obtidos nos ensaios de especificidade .....	41
Figura 9: Representação gráfica da curva analítica para a Hidroclorotiazida obtida por CLAE .....	43
Figura 10: Representação gráfica da curva analítica para o Aminobenzeno obtida por CLAE .....	43
Figura 11: Representação gráfica da curva analítica para a Clorotiazida obtida por CLAE .....	44
Figura 12: Alterações visuais provenientes do ensaio de fotoestabilidade .....	51
Figura 13: Tipos de diagramas de solubilidade de fase obtidos da formação de complexos de inclusão entre fármacos e CD .....	54
Figura 14: Perfis de solubilidade de fases obtidos para HCTZ: $\beta$ CD em diferentes concentrações de colato de sódio: .....	55

Figura 15: Entotermas obtidas através de DSC para HCTZ, $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 16: Curva de DSC obtida para $\beta$ CD. 1º aquecimento: 30 a 200 °C, 2º aquecimento: 30 a 300 °C.....	58
Figura 17: Curvas termogravimétricas obtidas para a HCTZ, $\beta$ CD e complexos de inclusão .....	60
Figura 18: Espectro de absorção infravermelho obtido para a hidroclorotiazida .....	62
Figura 19: Espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho para HCTZ, $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão .....	63
Figura 20: Perfis de dissolução obtidos para a HCTZ, complexos de inclusão e misturas físicas em fluido gástrico simulado (pH 1,2): .....	65
Figura 21: Resultados obtidos nos ensaios in-vivo para os complexos H $\beta$ C .....	69
Figura 22: Resultados obtidos nos ensaios in-vivo para os complexos H $\beta$ .....	70

## LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutico. ....	18
Tabela 2: Limites de detecção e quantificação para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida .....	45
Tabela 3: Resultados dos ensaios de repetibilidade para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida .....	45
Tabela 4: Resultados dos ensaios de precisão intermediária (inter-analistas) para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida .....	46
Tabela 5: Resultados dos ensaios de precisão intermediária (inter-dias) para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida .....	46
Tabela 6: Resultados dos ensaios de exatidão para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida .....	47
Tabela 7: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da hidroclorotiazida por CLAE. ....	48
Tabela 8: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do aminobenzeno por CLAE. ....	48
Tabela 9: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da clorotiazida por CLAE. ....	49
Tabela 10: Resultados do ensaio de fotoestabilidade.....	50
Tabela 11: Resultados do ensaio de solubilidade de fases para HCTZ: $\beta$ CD mediante adição de diferentes concentrações de colato de sódio:.....	56
Tabela 12: Coeficientes de permeabilidade obtidos para HCTZ livre, H $\beta$ , H $\beta$ C e suas respectivas misturas físicas. ....	66
Tabela 13: Quantidade total permeada para para HCTZ livre, H $\beta$ , H $\beta$ C e suas respectivas misturas físicas .....	67

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\alpha$ CD	Alfa-ciclodextrina
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
$\beta$ CD	Beta-ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CV%	Coefficiente de variação
COL	Colato de Sódio Hidratado
CTZ	Clorotiazida
DC	Débito Cardíaco
DSA	4-amino, 6-benzeno dissulfonamida
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EnaC	<i>Epithelial Sodium Channels</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGS	Fluido Gástrico Simulado
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
g.mol <sup>-1</sup>	grama/mol <sup>-1</sup>
$\gamma$ CD	Gama-ciclodextrina
HA	Hipertensão Arterial
HCTZ	Hidroclorotiazida
H $\beta$	Complexo hidroclorotiazida: $\beta$ -ciclodextrina

H $\beta$ C	Complexo hidroclorotiazida: $\beta$ -ciclodextrina:colato de sódio
h	Hora
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacologicamente Ativo
LdQ	Limite de Quantificação
LdD	Limite de Detecção
m/m	Massa/massa
mAU	<i>Mili Absorbance Units</i> (Unidades de absorbância)
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
NCX1	<i>Sodium-Calcium Exchanger</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PASMC	<i>Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
RVP	Resistência Vascular Periférica
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutico
TG	Termogravimetria
UV	Ultra-violeta
$\mu$ g	Micrograma

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Hipertensão .....	13
1.2 Diuréticos .....	15
1.3 Diuréticos Tiazídicos .....	16
1.4 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) .....	17
1.5 Hidroclorotiazida .....	19
1.5.1 HCTZ: Vias de síntese e produtos de degradação .....	20
1.6 Ciclodextrinas .....	21
1.7 Ácidos biliares .....	23
1.8 Caracterização físico-química .....	24
1.9 Estudos de estabilidade .....	25
2. OBJETIVOS .....	27
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Materiais .....	28
3.2 Métodos .....	30
3.2.1 Obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido .....	30
3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	30
3.2.2.1 Preparação das soluções .....	30
3.2.2.2 Condições cromatográficas .....	31
3.2.2.3 Validação do método por CLAE .....	31
3.2.2.3.1 Especificidade .....	31
3.2.2.3.2 Linearidade .....	32
3.2.2.3.3 Precisão .....	32
3.2.2.3.4 Exatidão .....	32
3.2.2.3.5 Limites de quantificação e detecção .....	33
3.2.2.3.6 Robustez .....	34
3.2.2.3.7 Aplicabilidade do método .....	34
3.2.3 Caracterização do estado sólido .....	34
3.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	34

3.2.3.2 Termogravimetria (TG).....	35
3.2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.2.4 Estudo de solubilidade de fases.....	35
3.2.5 Ensaio de dissolução .....	35
3.2.5.1 Preparação do meio.....	36
3.2.6 Estudo de permeabilidade aparente.....	36
3.2.7 Ensaio <i>in vivo</i> .....	37
3.2.7.1 Avaliação da atividade diurética <i>in vivo</i> .....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE para determinação de HCTZ e seus produtos de degradação .....	39
4.1.1 Validação da metodologia analítica .....	39
4.1.1.1 Especificidade .....	40
4.1.1.2 Linearidade.....	42
4.1.1.3 Limites de quantificação e detecção .....	44
4.1.1.4 Precisão .....	45
4.1.1.5 Exatidão .....	47
4.1.1.6 Robustez.....	47
4.1.1.7 Aplicabilidade do método .....	49
4.2 Estudo de solubilidade de fases.....	53
4.3 Caracterização físico-química da matéria-prima .....	56
4.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	56
4.3.2 Termogravimetria (TG).....	58
4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	61
4.4 Avaliação do perfil de dissolução.....	64
4.4.1 Fluido gástrico simulado (FGS).....	64
4.5 Estudos de permeabilidade aparente .....	66
4.6 Avaliação da diurese in-vivo .....	67
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

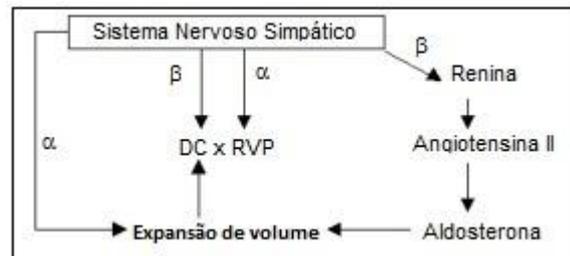
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hipertensão

A condição conhecida como hipertensão arterial (HA) é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo (ALMEIDA, 2015). Sua prevalência é de aproximadamente 30-45% na população em geral (FILIPOVSKI, 2015), e tende a aumentar com a idade e com a exposição constante a fatores de risco tais como tabagismo, obesidade, sedentarismo ou predisposição genética. A condição se caracteriza pelo aumento da pressão arterial sistêmica, e sua patogênese envolve vários mecanismos e vias metabólicas diferentes. Possui, desta maneira, uma gama distinta de etiologias, que é dependente de vários fatores, tanto ambientais quanto fisiológicos/bioquímicos (FRISO, 2015). Está associada a condições cardiovasculares mais graves, tais como infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, aterosclerose, problemas renais e acidente vascular cerebral. Dentre os mecanismos indutores da HA, podem-se destacar os mecanismos neurais, o sistema renina-angiotensina e a sensibilidade ao sódio.

O sistema nervoso autônomo tem participação importante no controle da pressão arterial. Isto se propõe através do modelo exposto na figura 1, que demonstra uma ativação exacerbada do mesmo, promovendo aumento do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (SANJULIANI, 2002). Há evidência concreta que a estimulação exacerbada do sistema nervoso simpático seja um dos desencadeadores da HA, visto que uma ativação simpática exagerada e mudanças na sensibilidade dos baroreceptores são observadas em pacientes com hipertensão arterial (OLIVEIRA-SALES, 2014). Vários estudos apontam que diminuições em certas catecolaminas plasmáticas ou o aumento na liberação e sensibilidade à norepinefrina também estariam relacionados ao surgimento da condição (MANCIA, 2013).

Figura 1: Relação do SNC no controle da pressão arterial  
(Fonte: Adaptado de Sanjuliani, 2002)



Onde: DC – Débito Cardíaco; RVP – Resistência Vascular Periférica. Uma ativação inadequada do sistema nervoso simpático pode ocasionar quadros de hipertensão arterial por diversas vias.

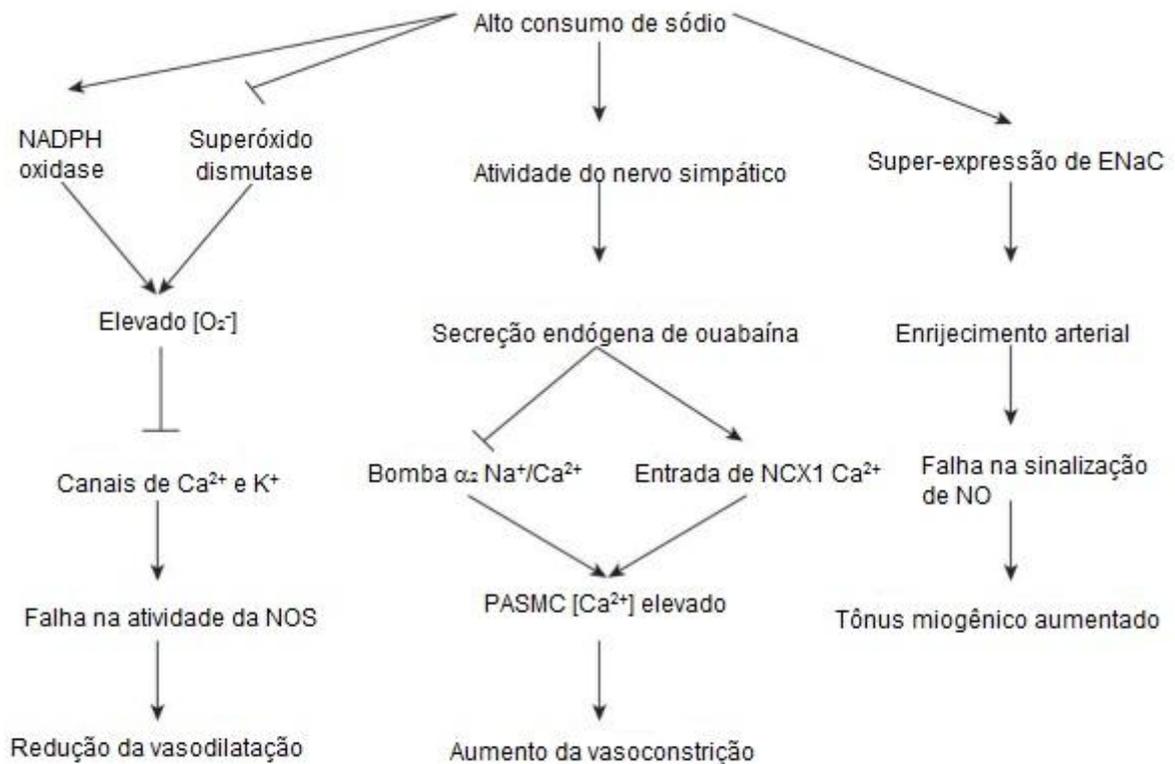
O sistema renina-angiotensina tem papel fundamental nas doenças cardiovasculares. Além de exercer efeito regulatório sobre a pressão arterial, age na contratilidade da musculatura das paredes dos vasos, remodelando-as (van THIEL, 2015). Através da liberação de renina pelas células justaglomerulares renais, há a formação de angiotensina I, biotransformada nos pulmões em angiotensina II pela enzima conversora da angiotensina (ECA), um octapeptídeo com grande potencial vasoconstritor, que é produzido quando há baixa concentração de aldosterona no organismo (SANJULIANI, 2002). Através de seu receptor AT1R, a angiotensina II interfere de forma negativa em muitas vias metabólicas que podem culminar em HA, podendo-se citar o aumento da reabsorção de sódio, o aumento da secreção de vasopressina, aldosterona e endotelina, contratilidade cardíaca e ativação exacerbada do sistema nervoso simpático (CAREY, 2015).

O consumo inadequado de sal também é um fator importante no desenvolvimento de HA. Os cátions  $\text{Na}^+$  contribuem para o equilíbrio osmótico do líquido extracelular e para a condução dos potenciais de ação neuronais, sendo recomendada uma ingestão de no máximo 2000 mg/dia de sódio segundo as instituições reguladoras (REDDY, 2015). Quando a quantidade de sódio ingerida é muito superior à recomendada, a tendência do organismo é a de reter água para conservar o equilíbrio osmótico, e com o aumento do volume sanguíneo, haverá aumento da pressão arterial. Alguns estudos propõem que o papel do sódio na HA se dá através de um aumento da atividade do sistema nervoso simpático, bem como que o sistema renal dopaminérgico tenha um importante envolvimento na regulação do mecanismo renal de excreção de sódio (SANJULIANI, 2002). A figura 2 apresenta alguns dos possíveis mecanismos de patogênese da HA através da ingestão de

sódio.

Figura 2: Mecanismos patológicos relacionados à ingestão de sódio

(Fonte: Adaptado de Reddy, 2015)



Onde: **EnaC** – Canal epitelial de sódio; **NO** - Óxido nítrico; **PASMC** – Células Musculares Lisas da Artéria Pulmonar; **NCX1** – Transportador de sódio/cálcio; **NOS** – Óxido Nítrico Sintetase.

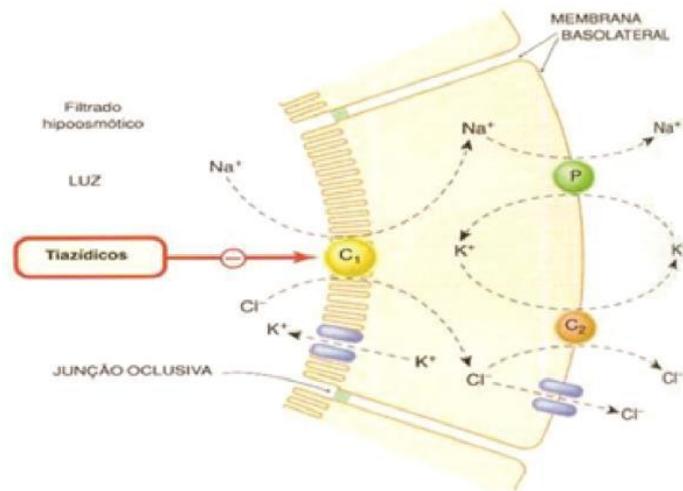
## 1.2 Diuréticos

Diuréticos são substâncias amplamente utilizadas para as mais diversas condições, tais como hipertensão, problemas cardíacos e distúrbios eletrolíticos (ROUSH, 2013). Tem como principal mecanismo de ação o bloqueio da recaptação de sódio pelos túbulos renais, consequentemente diminuindo a pressão sanguínea. Trata-se de um extenso grupo farmacológico, que compõe-se de: Inibidores da Anidrase Carbônica (Acetazolamida); Diuréticos de alça (Furosemida); Tiazídicos (Hidroclorotiazida); Pouparadores de potássio (Amilorida e Triantereno); Diuréticos osmóticos (Manitol); Antagonistas da vasopressina (ROUSH, 2013).

### 1.3 Diuréticos Tiazídicos

Os diuréticos tiazídicos compreendem um grupo farmacológico menos potente em comparação aos diuréticos de alça, porém muito melhor tolerados. Agem ligando-se ao sítio de ligação do cloreto do sistema de cotransporte tubular distal de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , promovendo natriurese através da excreção urinária (RANG, DALE, 2012). Como todos os diuréticos, os tiazídicos também podem provocar uma série de alterações eletrolíticas, tais como hipocalcemia, hiponatremia e desidratação. Estas complicações são mais comuns em pacientes com problemas cardíacos ou com cirrose hepática descompensada. Estudos ainda apontam que a HCTZ, um dos diuréticos tiazídicos mais utilizados no mundo, possa causar uma intolerância endógena à glicose, o que pode acarretar em um quadro de diabetes. Este efeito parece estar ligado à depleção de potássio causada pelo fármaco (FEILH, 2012). São utilizados em terapia combinada com diuréticos de alça, exercendo efeito sinérgico sobre a natriurese exercida pelos mesmos, melhorando assim o controle da pressão arterial. Esta combinação geralmente é utilizada em pacientes que utilizam diuréticos por longos períodos e desenvolvem hipertrofia do néfron distal. Finalmente, por exercer intensa excreção de potássio, pode ser útil no tratamento da hipercalemia provocada pelos diuréticos de alça (AGARWAL, 2012). A figura 3 demonstra o mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos.

Figura 3: Mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos  
(Fonte: adaptado de Rang *et al*, 2012)



Onde: C1: sistema de cotransporte de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>; C2<sup>+</sup>: cotransporte eletroneuro de K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>; P: bomba de sódio

#### 1.4 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

A biodisponibilidade oral de um fármaco é influenciada por sua velocidade de dissolução e sua permeabilidade intestinal. Fármacos com baixa permeabilidade e baixa dissolução tendem a apresentar valores de biodisponibilidade reduzidos, o que pode diminuir o efeito terapêutico esperado (JAMBHEKAR, 2013). Para se obter uma boa absorção, é necessário que o fármaco apresente capacidade de dissolver-se em meios fisiológicos e que consiga permear a membrana intestinal de maneira satisfatória. Vários fatores podem interferir na dissolução de um fármaco, e estes podem ser parâmetros físico-químicos (como difusão, polimorfismo ou tamanho de partícula) ou fisiológicos (como molhabilidade, pH do fluido gastrointestinal ou presença de surfactante no fluido gastrointestinal). Baseado nestes dois parâmetros Amidon e colaboradores propuseram em 1995 o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al*, 1995). Este sistema classifica os fármacos em quatro categorias distintas, de acordo com sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Sistema de Classificação Biofarmacêutico.

(Fonte: Adaptado de Amidon *et al*, 1995)

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Os fármacos inseridos na classe I são considerados altamente solúveis e permeáveis, tendo como fatores limitantes destas características o esvaziamento gástrico ou o perfil de dissolução do fármaco. Um fármaco é considerado muito solúvel quando a maior quantidade do mesmo presente em uma forma farmacêutica de liberação imediata dissolve-se completamente em 250 mL de água com pH entre 1,0 e 7,5. Porém, se o fármaco atingir a dissolução de pelo menos 85% em 30 minutos, pode-se garantir a biodisponibilidade do mesmo, e abaixo desta faixa é considerado pouco solúvel (AMIDON, GORDON L *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 2002; KASIM *et al.*, 2004).

A classe II compreende os fármacos pouco solúveis, porém altamente permeáveis. Para os fármacos inseridos nesta classe, o fator limitante de absorção é a dissolução *in vivo*, e seu perfil de absorção não será tão alto quanto aqueles pertencentes à classe I.

Inseridos na classe III estão os fármacos com alta solubilidade e baixa permeabilidade, sendo esta última o fator limitante de absorção nesta classe. Possuem perfis de dissolução *in vitro* semelhantes aos dos fármacos da classe I, porém sua permeabilidade intestinal é reduzida. Os fármacos da classe III possuem perfis altamente variáveis de absorção porque a permeabilidade intestinal é dependente da velocidade de esvaziamento gástrico. (AMIDON, 1995).

Na classe IV encontram-se os fármacos com baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Membros deste grupo possuem absorção significativamente reduzida e conseqüente queda em sua biodisponibilidade, sendo bastante difícil estabelecer uma correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON 1995).

Atualmente, mesmo com o avanço da tecnologia

biofarmacêutica/biofarmacotécnica, aproximadamente 40% dos fármacos em desenvolvimento e 60% dos fármacos obtidos por síntese têm perfis de solubilidade considerados baixos e não exercem seu efeito terapêutico máximo relacionado à dose devido à baixa biodisponibilidade oral. Novas estratégias tem sido desenvolvidas visando a melhoria destas características, tais como dispersões sólidas com polímeros hidrofílicos, microemulsões, uso de co-solventes, formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas e a formação de sais (EL-GIZAWY, 2015).

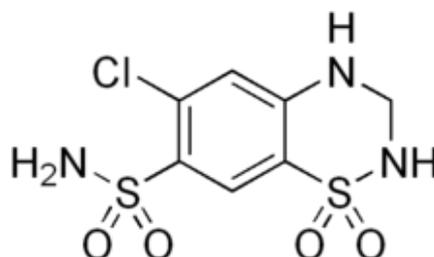
### 1.5 Hidroclorotiazida

A HCTZ (Figura 4), é um diurético tiazídico de fórmula  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ , sendo composta por dois grupos sulfonamida (SANPHUI, 2013). É conhecida há mais de meio século, e mesmo assim encontra-se entre os farmacos mais prescritos no mundo (MESSERLI, 2011). Seu mecanismo de ação consiste na inibição do sistema de contransporte de íons sódio-cloreto no túbulo distal, diminuindo a reabsorção de sódio e conseqüentemente aumentando sua excreção, exercendo desta forma a diurese. Produz também, certa resistência vascular periférica, contribuindo assim para o efeito anti-hipertensivo. Indiretamente a HCTZ reduz o volume plasmático, aumentando a excreção urinária de potássio, a atividade da renina plasmática, a secreção de aldosterona e promove diminuição do potássio plasmático (PIRES, 2011a). É utilizada primariamente em casos de hipertensão arterial, sozinha ou associada a outros farmacos (SANTOVEÑA, 2011). É também, fármaco de escolha em casos de falha cardíaca por hipertensão, por promover efeitos mais duradouros (JINGHONG, 2011).

Apesar de sua ampla utilização, trata-se de um fármaco classificado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como classe IV, ou seja, baixa permeabilidade ( $\log$  de  $P = -0,07$ ) e baixa solubilidade ( $0,7 \text{ mg/mL}^{-1}$  a  $25^\circ \text{C}$ ). Seus valores de  $pK_a$  são 8,75 e 9,88, estando em sua forma ionizada em pH próximo de 6 (BAKA, 2008). Possui biodisponibilidade de aproximadamente 65% (SANPHUI, 2013), característica que reduz consideravelmente sua ação terapêutica. A HCTZ é um pó cristalino, branco ou quase branco, praticamente inodoro e com gosto levemente amargo. Possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente 3 ou 4 horas, meia-vida biológica de 12 horas, sendo excretada inalterada na urina

(SANTOVENIA, 2011).

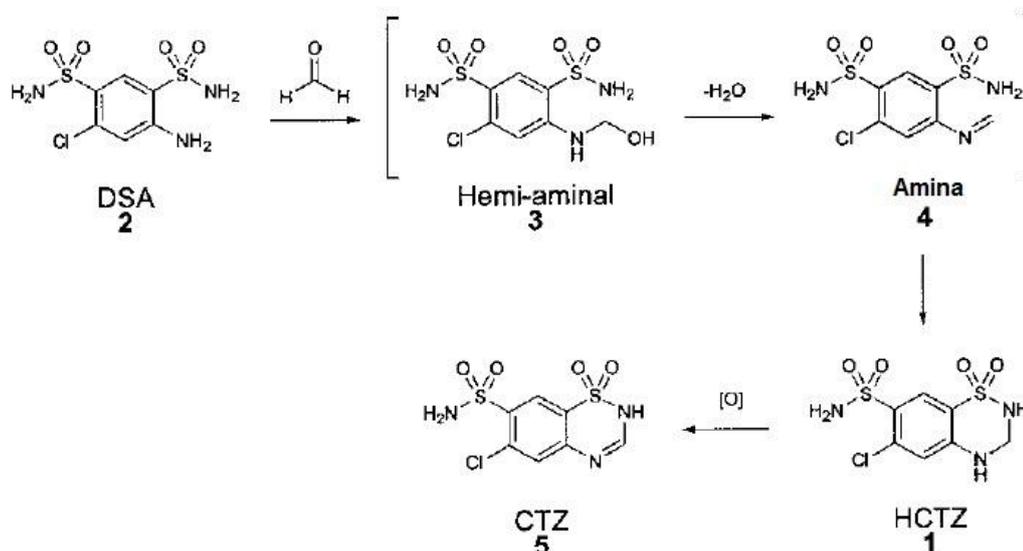
Figura 4: Estrutura química da hidroclorotiazida  
(Fonte: Adaptado de United States Pharmacopeia, 2011.)



### 1.5.1 HCTZ: Vias de síntese e produtos de degradação

A HCTZ é obtida através da combinação de aminoclorobenzeno dissulfonamida (aminobenzeno, DSA) e formaldeído em meio aquoso básico. Este processo gera também a clorotiazida (CTZ), através de uma reação de oxidação. Esta última é considerada uma impureza, visto que exerce menor poder terapêutico que a HCTZ (FANG *et al.*, 2001). A figura 5 mostra resumidamente a via de síntese da HCTZ.

Figura 5: Via de síntese da hidroclorotiazida  
(Fonte: Adaptado de Fang *et al.*, 2011)



A degradação da HCTZ ocorre através de hidrólise irreversível. Esta reação é pH dependente e apresenta pico de degradação em pH 7,2 e mínimo em pH entre 2,2 e 3,0. Tem como produtos o DSA e o formaldeído. Já a CTZ é obtida através de uma reação de oxidação e não de hidrólise (DEVENTER *et al.*, 2009; HERTZOG *et al.*, 2002; MOLLICA *et al.*, 1969; MOLLICA *et al.*, 1971).

## 1.6 Ciclodextrinas

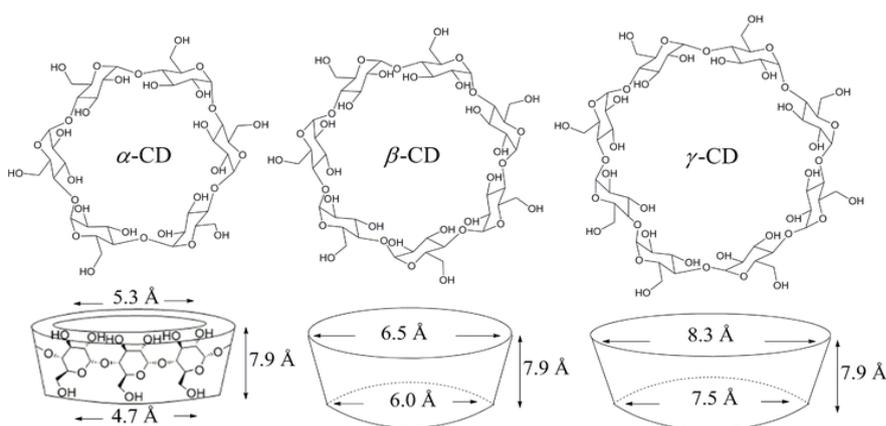
As ciclodextrinas compreendem uma família de oligossacarídeos cíclicos isolados do amido. O amido é composto de unidades de D-Glucopiranosose, possuindo ligações glicosídicas em a 1,4 e a 1,6 (DAVIS, 2004). Através da degradação do amido pela enzima glicosiltransferase, são gerados oligômeros cíclicos denominados ciclodextrinas ou cicloamilases (BARRETO, 2008). Estas são moléculas glicosídicas que possuem uma cavidade vazia e tem a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variada gama de compostos orgânicos, inorgânicos, biológicos e farmacêuticos (SILVA, 2013). Por possuírem uma superfície hidrofílica e uma cavidade hidrofóbica, apresentam elevada eficácia no transporte de fármacos com baixa solubilidade aquosa dentro de meios fisiológicos, através da modificação de suas características físico-químicas (MURA, 2014).

Quanto à classificação, esta se dá de acordo com a quantidade de moléculas de glicose que as forma, sendo que as mais conhecidas são a  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD), formada por um hexâmero glicosídico; a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), formada por um heptâmero glicosídico; e a  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD) formada por um octâmero glicosídico (DAVIS, 2004), como demonstrado na figura 6. Devido a seu alto rendimento através da degradação do amido estas são denominadas ciclodextrinas naturais, sendo a  $\beta$ -ciclodextrina a mais pesquisada devido as características favoráveis à formação de complexos de inclusão com a maioria dos fármacos conhecidos (BARRETO, 2008), mesmo que possuindo uma menor solubilidade aquosa (LIANDONG, 2012). Tendo em vista estas limitações, foram desenvolvidas ciclodextrinas sintéticas para melhora do perfil de dissolução, bem com maior controle na liberação do fármaco da cavidade da CD (YUAN, 2013), como por exemplo a Hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina, um derivado hidroxialquil, com elevada solubilidade aquosa e menor toxicidade, representando uma alternativa às ciclodextrinas naturais (YUAN, 2013).

A complexação de fármacos com ciclodextrinas demonstra acentuada

melhoria nos perfis de estabilidade, solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade de fármacos, razão pela qual ganhou visibilidade, sendo amplamente estudada por suas propriedades físico-químicas favoráveis. Zhang *et al* (2015) complexaram o anti-inflamatório não esteroide Flurbiprofeno com ciclodextrinas, melhorando assim o perfil de biodisponibilidade do mesmo. Já Tang *et al* (2015) obtiveram complexos entre o miorelaxante Clorzoxazona e ciclodextrinas, diminuindo significativamente sua toxicidade e melhorando sua solubilidade intrínseca.

Figura 6: Aspectos conformacionais das ciclodextrinas  
(Fonte: Adaptado de Freitag, 2010)



As ciclodextrinas naturais são classificadas de acordo com o número de moléculas de açúcar que as forma. α-CD com 6 moléculas; β-CD com 7 moléculas e γ-CD, com 8 moléculas.

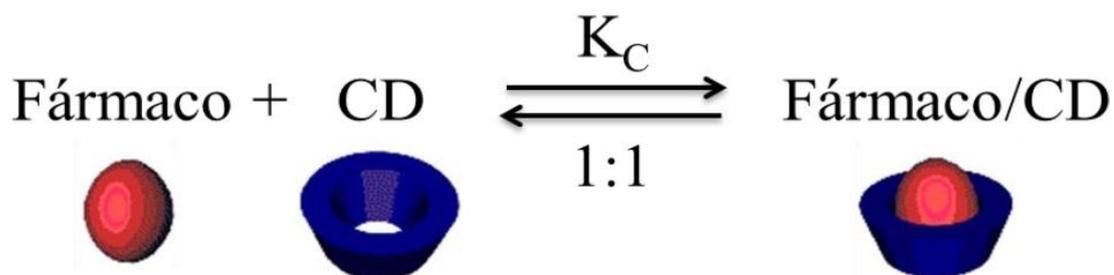
Atualmente é possível afirmar que a tecnologia de complexação com ciclodextrinas é realmente promissora e pode ser utilizada para obtenção de medicamentos com melhores perfis de dissolução, solubilidade e permeabilidade quando comparados ao fármaco puro. A formação dos complexos se dá em meio aquoso, através da substituição da água presente na cavidade da ciclodextrina pela molécula-hóspede, já que a mesma apresenta-se mais energeticamente favorável (pois a água é menos apolar que a molécula-hóspede). Não há formação de ligações covalentes durante a complexação, e sua estabilidade química se dá através de ligações não-covalentes, como ligações de Vander Walls, interações hidrofóbicas e efeitos eletrônicos (LOFTSSON *et al.*, 2007; RASHEED; KUMAR;

SRAVANTHI, 2008).

Dentre as técnicas para obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas pode-se citar a co-precipitação, co-evaporação, neutralização e liofilização, que são procedimentos utilizados em fase líquida. Em fase semi-sólida, o método utilizado é a malaxagem, e este é aplicado quando a molécula-hóspede é pouco solúvel em água. Consiste na adição gradual do fármaco à uma pasta aquosa de CD, e posterior secagem, que pode ser efetuada através de *spray-drying* ou liofilização. Para a complexação da HCTZ com a  $\beta$ CD, o processo de malaxagem melhorou características importantes na formação do sistema binário, tal como o nível de inserção da molécula-alvo na cavidade da CD (MENDES, 2013). A figura 7 demonstra a equação de formação de complexo entre a HCTZ e  $\beta$ CD.

Figura 7: Equação representativa da formação do complexo de inclusão entre fármaco e CD na proporção molar 1:1

(Fonte: Mendes, 2013)



### 1.7 Ácidos biliares

Ácidos biliares são sintetizados nos hepatócitos a partir do colesterol, e armazenados no fígado na forma de seus sais. Agem como surfactantes, tendo um importante papel na digestão e absorção de nutrientes (MALDONADO-VALDERRAMA, 2011). Possuem núcleo esteróide, e sua diferenciação se dá através da quantidade, da disposição e da estereoquímica dos grupos hidroxila que possuem em seu núcleo esteroidal (OLESEN, 2015). São classificados em dois grupos, primários e secundários. Ácidos biliares primários são sintetizados através dos hepatócitos, em um processo que envolve várias vias metabólicas e ações enzimáticas, e na maioria dos mamíferos, os principais ácidos biliares endógenos

são o Ácido Cólico e o Ácido Chenodeoxicólico. Os ácidos biliares secundários são formados quase em sua totalidade no intestino grosso, através de hidrólise bacteriana, visto que muitas bactérias intestinais possuem hidrolases que são capazes de reagir com ácidos biliares conjugados (HOLM, 2013).

Os ácidos biliares são utilizados como carreadores farmacológicos pela grande capacidade de solubilização e emulsificação. Através destas características melhoram a biodisponibilidade, alterando a velocidade de dissolução de fármacos no trato gastrointestinal (CHUN, 2012). São substâncias naturais bi-planares que possuem duas superfícies moleculares com funcionalidades diferentes: uma face hidrofóbica convexa do núcleo esteróide e uma face hidrofílica côncava (SILVA, 2013). Soluções micelares compostas de sais biliares podem influenciar no perfil de solubilização de substâncias orgânicas pouco solúveis em meio aquoso, bem como aumentar a permeabilidade celular frente às mais variadas substâncias (SILVA, 2013).

### **1.8 Caracterização físico-química**

O conhecimento das propriedades físico-químicas de uma fármaco é crucial para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Características como ponto de fusão, tamanho e forma das partículas podem fornecer informações importantes sobre possíveis interações entre o fármaco e seus excipientes, que podem comprometer aspectos importantes do mesmo, principalmente sua estabilidade e biodisponibilidade (BERNARDI *et al.*, 2009; CHADHA; BHANDARI, 2014; CHAKRABORTY *et al.*, 2013; McDAID *et al.*, 2003). A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), a Termogravimetria (TG) e a Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) são técnicas que permitem a caracterização, sendo de grande auxílio no conhecimento das possíveis interações entre componentes da formulação.

A Análise Térmica compreende um conjunto de técnicas onde alguma propriedade física do analito é analisada em função do aumento de temperatura (ROUQUEROL, 2013). As técnicas mais conhecidas dentro da análise térmica são a TG e a DSC. Na DSC, o fármaco e seus excipientes são submetidos ao aquecimento constante e através da variação nos valores de entalpia ou desaparecimento de picos exotérmicos ou endotérmicos presentes na curva pode-se

obter informações sobre possíveis interações entre o fármaco e os excipientes, bem como sobre o deslocamento do ponto de fusão das amostras. A DSC também é importante na caracterização de complexos de inclusão, pois tem a capacidade de identificar a complexação verdadeira, pois quando há formação de complexo o ponto de fusão do fármaco aumenta, há um alargamento do evento térmico ou há a aparição de novos eventos endotérmicos (LI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A Termogravimetria consiste na avaliação do diferencial de massa da amostra quando submetida à aquecimento em atmosfera controlada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). É importante na avaliação da estabilidade térmica, e também na identificação dos níveis de umidade do analito.

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica que consiste na identificação de bandas características de certos compostos através de seu espectro no infravermelho. É utilizada nos estudos de polimorfismo, elucidação de estrutura, interações entre misturas binárias (fármaco-excipiente), entre outras (KALINKOVA, 1999).

## **1.9 Estudos de estabilidade**

Segundo a definição da ANVISA, estabilidade “é a capacidade de um produto manter inalterável suas propriedades e seu desempenho durante um tempo definido, de acordo com as condições previamente estabelecidas, relacionadas a sua identidade, concentração ou potência, qualidade, pureza e aparência física”. Todas as formas farmacêuticas conhecidas possuem vias de degradação, que são ativadas mediante os mais variados estímulos externos tais como umidade, luz, temperatura ou contaminação microbológica. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através de sua RDC Nº 58/2013 estipula requisitos mínimos a serem realizados para determinação de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos, tais como estudos de degradação, considerações sobre rotulagem e armazenamento e estudos de fotoestabilidade (BRASIL, 2012).

Melhorar a solubilidade e permeabilidade de fármacos com baixo perfil de dissolução consiste em um dos maiores desafios no melhoramento de Insumos Farmacologicamente Ativos (IFA) e desenvolvimento de novas formulações. Existem variadas alternativas para a melhoria das características físico-químicas de IFA's,

dentre elas a complexação, formação de sais, co-cristalização e amorfização (CHADHA, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar *in vitro* e *in vivo* complexos de hidroclorotiazida com  $\beta$ -ciclodextrina e adição de colato de sódio.

### 2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Obter os complexos de inclusão entre a hidroclorotiazida e a  $\beta$ -ciclodextrina; e entre a hidroclorotiazida,  $\beta$ -ciclodextrina e colato de sódio através de malaxagem seguida de liofilização;
- 2.2.2 Realizar a caracterização físico química dos complexos através de Calorimetria Exploratória Diferencial, Termogravimetria e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier;
- 2.2.3 Desenvolver metodologia indicativa de estabilidade através de cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE);
- 2.2.4 Realizar o estudo de fotoestabilidade;
- 2.2.5 Avaliar o perfil de dissolução *in vitro* em fluido gástrico simulado;
- 2.2.6 Realizar ensaios de permeabilidade aparente;
- 2.2.7 Avaliar a atividade diurética *in vivo* do complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina e colato de sódio.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Materiais, substâncias e reagentes utilizados:

- acetonitrila, grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA);
- ácido clorídrico (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- ácido fosfórico (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha).
- 4-amino, 6-cloro, 1.3-benzeno-dissulfonamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- $\beta$ -ciclodextrina (Roquette Corporate, Lestrem, França);
- cloreto de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- clorotiazida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- colato de sódio hidratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- fosfato de potássio monobásico (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- hidroclorotiazida (Galena, Campinas, SP, Brasil);
- hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- membrana acetato de celulose de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).
- Lâmpada germicida UV-C 15 watts (OSRAM, Munique, Alemanha);
- Lâmpada fluorescente OSRAM 15 watts (OSRAM, Munique, Alemanha);
- Lâmpada UV-A 15 watts (SCT, São Paulo, Brasil)
- Metanol, grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- papel filtro quantitativo 28 $\mu\text{m}$  (J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- peróxido de hidrogênio (Synth, Diadema, SP, Brasil).

Equipamentos:

- Balança analítica Shimadzu AUX220 (Kyoto, Japão);

- Calorímetro Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japão);
- Cromatógrafo Shimadzu LC 10AVP (Kyoto, Japão);
- Dissolutor Agilent 708-DS (Santa Clara, CA, EUA);
- Espectrofotômetro Agilent Cary 100 UV-VIS (Santa Clara, CA, EUA).
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Frontier Perkin Elmer Prestige (Massachusetts, EUA);
- Liofilizador Terroni LD 1500 (São Paulo, SP, Brasil);
- pHmetro Hanna EDGE (Barueri, SP, Brasil);
- Sistema de purificação Milli-Q Merck Millipore (Darmstadt, HE, Alemanha);
- Termobalança Shimadzu TGA-50 (Kyoto, Japão);

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Obtenção dos complexos de inclusão no estado sólido**

Os complexos de inclusão entre a  $\beta$ CD, HCTZ e COL foram obtidos através de malaxagem seguida de liofilização, uma vez que os complexos obtidos por esta técnica apresentaram aumento no grau de inserção entre a molécula-hóspede e o fármaco (MENDES, 2013). Pesou-se alíquotas estequiometricamente proporcionais de  $\beta$ CD:HCTZ (1:1 M) e  $\beta$ CD:HCTZ:COL (1:1:0,16 M) e misturou-se em gral de porcelana por 20 minutos. Após este processo, adicionou-se 1 mL de água ao pó e misturou-se por mais 5 minutos. Adicionou-se 50 mL de água a 40 °C à mistura e o pH da solução resultante foi ajustado para 3,0. A solução foi levada à agitação magnética por 20 minutos e 40 °C, filtrada, congelada a -40 °C por 24 horas e então liofilizada.

### **3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência**

Para o desenvolvimento do método, as condições cromatográficas foram otimizadas de acordo com metodologias previamente validadas (JOSHI, 2010; SHAIKH, 2008; ANANDKUMAR, 2013; HACIOGLU, 2012). Os parâmetros verificados foram especificidade, linearidade, limite de quantificação (LdQ), limite de detecção (LdD), precisão, exatidão e robustez.

#### **3.2.2.1 Preparação das soluções**

Para a preparação das soluções-mãe, uma alíquota exata de HCTZ foi pesada e, em seguida, diluída com metanol, até atingir a concentração de 500  $\mu$ g/mL. O mesmo procedimento foi realizado para os produtos de degradação DSA e CTZ, ambos diluídos até concentração de 500  $\mu$ g/mL. Na preparação das soluções que continham os complexos de inclusão  $\beta$ CD:HCTZ,  $\beta$ CD:HCTZ:COL e suas misturas físicas, a quantidade pesada foi de aproximadamente 40 mg devido à proporção teórica da amostra (1:1:0,16 M). As soluções de trabalho foram preparadas diariamente e diluídas adequadamente em fase móvel. As soluções-mãe foram armazenadas a 2 – 8 °C e protegidas da luz.

### 3.2.2.2 Condições cromatográficas

- Coluna cromatográfica Phenomenex Gemini Fusion C<sub>18</sub> (150 mm x 4,60 mm; 5 µm);
- Eluição isocrática;
- Vazão da fase móvel: 1 mL/min;
- Composição da fase móvel: acetonitrila:metanol:tampão fosfato monobásico – pH 3; 0,02M (9:9:82 v/v/v) ;
- Temperatura 40 °C;
- Comprimento de onda: 270 nm;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Tempo de eluição: 10 minutos;
- Detector espectrofotométrico UV-Vis;
- Integração do método: Slope – 800; Width – 5;

A fase móvel foi previamente filtrada à vácuo e degaseificada por membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm.

### 3.2.2.3 Validação do método por CLAE

O desenvolvimento e validação da metodologia é um fator crucial na descoberta, produção e melhoria de produtos farmacêuticos. A International Conference on Harmonisation (ICH) preconiza uma variedade de ensaios que determinam se o método é adequado para o que se propõe. Os ensaios realizados foram: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

#### 3.2.2.3.1 Especificidade

Soluções contendo misturas de todos os excipientes e produtos de degradação foram preparadas, devidamente diluídas em fase móvel e injetadas no sistema cromatográfico para verificação de seus picos. Soluções de HCTZ (1 mg/mL) foram preparadas e submetidas a diversas condições de estresse como preconizado pelo ICH Q2R1 (ICH, 2005). Alíquotas foram acondicionadas em tubos de ensaio, seguidos dos seguintes reagentes: HCl 1 M (hidrólise ácida); NaOH 1 M (hidrólise

básica); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (oxidação); e H<sub>2</sub>O mediante com aquecimento a 80 °C (hidrólise neutra). Todas as amostras foram deixadas sob reação durante 4 horas e, ao final deste período, foram devidamente diluídas (15 µg/mL) em fase móvel e analisadas por CLAE. Também foram realizados ensaios de fotólise. A amostra sólida foi submetida à radiação fluorescente (luz do dia) por 16 dias, totalizando 1,2 milhões de LUX/h e radiação UV (UVC – emissão máxima de 254 nm) por 48 horas, como preconizado pelas agências reguladoras. A presença de interferência foi determinada através da injeção de amostra contendo todos os excipientes da formulação (placebo) e uma amostra da HCTZ.

#### **3.2.2.3.2 Linearidade**

Para a linearidade foram construídas três curvas de calibração independentes para a HCTZ e para seus produtos de degradação DSA e CTZ. As curvas foram construídas em triplicata e em sete concentrações diferentes para a HCTZ (0,16, 1, 5, 10, 15, 20 e 30 µg/mL) e cinco concentrações para o DSA e CTZ (0,1, 0,5, 1,5 e 10 µg/mL). Os coeficientes de correlação e inclinações das curvas foram obtidos através da plotagem da área dos cromatogramas obtidos *versus* a concentração teórica da amostra, e cada curva foi analisada através de regressão linear.

#### **3.2.2.3.3 Precisão**

A precisão foi calculada pela variação no doseamento da amostra e foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para a repetibilidade, foram realizadas seis avaliações da mesma amostra, no mesmo dia e com as mesmas condições de análise. Para a precisão intermediária, foram realizados ensaios inter-dia, em três dias diferentes e com diferentes analistas. As áreas dos picos foram obtidas e comparadas. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (RSD%).

#### **3.2.2.3.4 Exatidão**

A exatidão foi avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas dos padrões adicionados em uma solução placebo. Uma solução contendo 20 µg/mL de HCTZ e seus produtos de degradação CTZ e DSA foi preparada, e quantidades

pré-determinadas foram pipetadas para a obtenção de soluções com as concentrações finais de 12, 15 e 18 µg/mL para a HCTZ e 0,8, 1 e 1,2 µg/mL para CTZ e DSA. Estas concentrações correspondem a 80, 100 e 120% da concentração nominal analítica, como preconizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Os cálculos de recuperação foram realizados de acordo com a equação 1:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### 3.2.2.3.5 Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e de detecção foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto com o eixo y da média de três curvas de calibração, utilizando modelo de regressão linear, tal como definido pelo ICH (ICH, 2005). O limite de quantificação foi estabelecido como a mais baixa concentração absoluta da substância em análise que pode ser quantificada em uma solução de amostra. O limite de detecção foi estabelecido como a mais baixa concentração absoluta da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram realizados através das equações 2 e 3 respectivamente.

$$\text{LD} = \frac{\text{DP} \times 3}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{LQ} = \frac{\text{DP} \times 10}{\text{IC}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

DP = desvio padrão do intercepto,  
IC = inclinação da curva de calibração.

### **3.2.2.3.6 Robustez**

A robustez de um método analítico é avaliada através de pequenas modificações em alguns dos parâmetros do mesmo. A robustez do método proposto foi avaliada através de mudanças em: I - a temperatura da coluna em  $40 \pm 2$  °C; II - o pH da fase móvel em  $3,0 \pm 0,2$ ; III – o fluxo de  $1 \pm 0,2$  mL/min. A estimativa da robustez do método foi determinada pela percentagem de doseamento de uma mesma amostra.

### **3.2.2.3.7 Aplicabilidade do método**

Os ensaios de fotodegradação foram realizados em câmara de fotoestabilidade com lâmpada fluorescente simulando a luz do dia e UV (UVC - emissão máxima de 254 nm) até as amostras atingirem a quantidade de 1,2 milhões de LUX, como preconizado pela RDC 45/2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Amostras de HCTZ pura, complexos de inclusão e suas misturas físicas foram expostas à radiação por 16 dias (lâmpada fluorescente) e 48 horas (UVC). Após a exposição, alíquotas foram pesadas e solubilizadas em metanol. As soluções obtidas foram então diluídas em fase móvel e analisadas por CLAE.

## **3.2.3 Caracterização do estado sólido**

A caracterização física da HCTZ, seus excipientes e produtos de degradação foi realizada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### **3.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As curvas DSC foram obtidas utilizando cadinhos de alumínio com cerca de 2 mg de amostra. A faixa de temperatura foi de 25-300 °C com razão de aquecimento de  $10$  °C  $\text{min}^{-1}$  em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  ( $50$  mL  $\text{min}^{-1}$ ). O equipamento de DSC foi calibrado com padrão de referência de índio (pf  $156,6$  °C;  $\Delta H_{\text{fus}} = -28,54$  g $^{-1}$  J) e zinco (pf  $419,5$  °C).

### 3.2.3.2 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada em faixa de temperatura de 30 a 600 °C, utilizando cadinhos de platina, com cerca de 4 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos em espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer Prestige, dentro de um intervalo de varredura de 4000-600 cm<sup>-1</sup>, com uma média de mais de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Um espectro de fundo (branco) foi obtido para cada condição experimental.

### 3.2.4 Estudo de solubilidade de fases

Para a avaliação do perfil de solubilidade da HCTZ foi empregada a técnica *shake-flask saturation* estabelecida por Higuchi e Connors (1965). Uma alíquota de 10 mg de HCTZ (excesso) foi adicionada a soluções aquosas contendo concentrações crescentes de βCD em uma faixa entre 0 e 12,25 mM. A quantidade de colato utilizada foi crescente, nas concentrações 1, 2, 5, 10 e 25 mM. Ambas as soluções (βCD e COL) foram submetidas à sonicação por 30 minutos. Após este procedimento, o pH das soluções foi ajustado para 3,3 com ácido cítrico 2%, e as mesmas foram levadas à agitação por 24 horas à 150 rpm e 25 °C. A leitura das amostras foi realizada através de espectroscopia na região do UV, em 273 nm, e a quantidade de HCTZ solubilizada foi calculada através da equação da reta obtida ( $y=0,062X + 0,0076$ ).

### 3.2.5 Ensaio de dissolução

Com o propósito de avaliar os diferentes perfis de liberação da HCTZ pura, suas misturas físicas e complexos de inclusão, foram realizados ensaios de dissolução com os seguintes parâmetros:

- Aparatos e velocidade de agitação: Aparato I (cesta) a 75 rpm;
- Meios de dissolução: fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2)

- Temperatura:  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ ;
- Volume do meio: 900 mL;
- $\lambda = 273 \text{ nm}$ .

Cápsulas de tamanho 0, contendo aproximadamente 50 mg de HCTZ, complexos de inclusão e misturas físicas foram preparadas em triplicata e submetidas à dissolução em meio gástrico simulado sem enzimas. Foram retiradas alíquotas de 10 mL de cada cuba no tempo de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos, com reposição de 10 mL de meio em cada tempo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 273 nm, e os cálculos efetuados levaram em conta a reposição de meio.

### 3.2.5.1 Preparação do meio

*Fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2):*

Pesou-se 2 g de cloreto de sódio e dissolveu-se em 500 mL de água, adicionou-se 7,0 mL de ácido clorídrico P.A. (37%), e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Ajustou-se pH para 1,2 com soluções de NaOH e ácido cítrico a 10%. Os meios foram previamente filtrados à vácuo para degaseificação e para a retirada de interferentes, como preconizado pela United States Pharmacopeia (USP, 2011).

### 3.2.6 Estudo de permeabilidade aparente

Para avaliação da permeabilidade aparente foi empregado o modelo de permeabilidade intestinal com células Caco-2. Células Caco-2 (ATCC # HTB 37, passagens 114-115) foram cultivadas conforme padronização no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (KRATZ *et al.*, 2011). Para os experimentos de transporte, monocamadas celulares foram cultivadas em insertos com membranas permeáveis de policarbonato, em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$ , com uma densidade de 100.000 células por inserto, por um período entre 21-25 dias para permitir a diferenciação celular. A integridade da monocamada celular foi avaliada rotineiramente através da resistência elétrica transepitelial (TEER)

e da permeabilidade do marcador fluorescente *lucifer yellow* (100 ug/mL). Para os experimentos foram empregadas apenas monocamadas com valores de TEER acima de 200  $\Omega/\text{cm}^2$  e valores de permeabilidade para o marcador inferiores a  $5 \times 10^{-7}$  cm/s. Os experimentos de transporte foram realizados no sentido apical-basolateral (absortivo), empregando como tampão de transporte o tampão aquoso HBSS (pH 6,5 e 7,4 nos compartimentos apical e basolateral, respectivamente, a fim de mimetizar as condições *in vivo*). Como solução doadora foram empregadas soluções de hidroclorotiazida (150  $\mu\text{M}$ ) ou de seus complexos com concentração equivalente de fármaco. Em intervalos apropriados, alíquotas foram retiradas do compartimento receptor e um volume equivalente de tampão foi repostado. Ao final do experimento (90 min), alíquotas foram retiradas do compartimento doador para o cálculo do balanço de massa. As amostras foram analisadas logo após os experimentos por CLAE, empregando-se metodologia analítica previamente validada. Os resultados foram expressos como coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{\text{app}}$ ), calculados de acordo com a equação:  $P_{\text{app}} = (\Delta Q/\Delta t) \times 1/AC_0$ , onde  $\Delta Q/\Delta t$  representa a taxa de permeabilidade (quantidade de amostra permeada por segundo);  $A$  é a área de difusão das células (filtro) e  $C_0$  é a concentração inicial da amostra. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA).

### 3.2.7 Ensaios *in vivo*

Para a realização dos estudos *in-vivo*, ratos Wistar fêmeas (pesando entre 210-250 g), foram mantidos em ambiente controlado, com uma temperatura de  $22^\circ \text{C} \pm 2^\circ$  e com ciclos de dia e noite de 12 horas cada. Os animais tiveram livre acesso à comida e água, e todos os protocolos preconizados pelo Comitê de Ética Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina foram realizados, estando o experimento de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

#### 3.2.7.1 Avaliação da atividade diurética *in vivo*

A atividade diurética dos complexos contendo a HCTZ foi avaliada por uma metodologia já amplamente descrita (KAU *et al*, 1984), com algumas pequenas modificações. Os animais foram distribuídos de forma randomizada em quatro grupos com seis indivíduos cada. O Grupo I recebeu os complexos de inclusão com

a HCTZ, com adição do colato de sódio. O Grupo II recebeu a mistura física. O Grupo III recebeu HCTZ pura, na concentração de 10 mg/kg, e o grupo quatro (controle), não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após este processo, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas com livre acesso a água e comida, e a excreção urinária foi mensurada em diferentes intervalos de tempo – 2; 4, 8 e 24 horas. A excreção urinária cumulativa foi calculada em relação ao peso dos animais, e expressa por mL/100 g. Para minimizar o erro relativo ao volume de líquido ingerido pelo animais e à variação urinária interindividual, a concentração eletrolítica ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , e  $\text{Cl}^-$ ) também foi avaliada através de um método ion-seletivo em um Dade Behring Dimension RXL Analyzer.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE para determinação de HCTZ e seus produtos de degradação**

O desenvolvimento de uma metodologia adequada para determinação da HCTZ em diversas condições foi baseado em métodos previamente validados (JOSHI, 2010; SHAIKH, 2008; ANANDKUMAR, 2013; HACIOGLU, 2012), a fim de se obter uma melhor resolução e simetria de pico para a HCTZ, seus complexos de inclusão com CD e seus produtos de degradação.

Para a determinação da fase móvel, várias combinações foram testadas. Para o tampão, fosfato de sódio monobásico e fosfato de potássio monobásico (pH 3,0; 0,02 M) foram testados e o tampão potássico obteve um melhor desempenho. Os solventes orgânicos testados para a fase móvel foram acetonitrila e metanol, e a combinação de ambos em diferentes concentrações. A combinação tampão fosfato monobásico, acetonitrila e metanol (82:9:9 v/v/v) respectivamente, foi escolhida por apresentar um tempo de retenção relativamente baixo de 7,5 minutos para a HCTZ, 5,2 minutos para o DSA e 6,4 minutos para a CTZ. Não houve interferência de seus excipientes,  $\beta$ CD e colato de sódio hidratado, visto que os mesmos não possuem absorção no espectro UV por não possuírem grupos cromóforos em suas estruturas.

#### **4.1.1 Validação da metodologia analítica**

O processo de validação de metodologia analítica é crucial para averiguar se o método é realmente aplicável ao fim que se destina. Segundo a ANVISA, “A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. A metodologia desenvolvida por CLAE teve por objetivo estabelecer melhores condições de identificação e quantificação para a HCTZ, seus produtos de degradação e complexos de inclusão com  $\beta$ CD e colato de sódio hidratado. O processo de validação compreende os ensaios de especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003,

ICH, 2005).

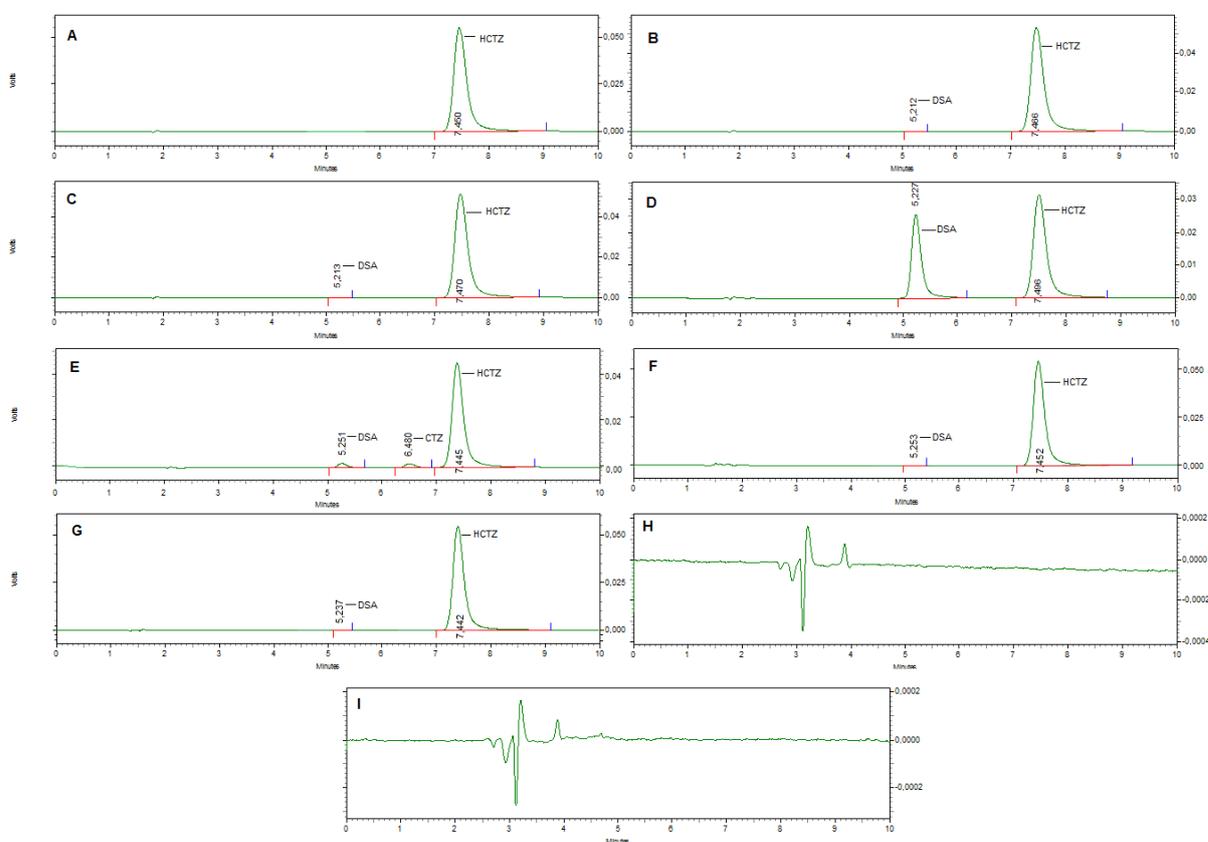
#### 4.1.1.1 Especificidade

Um método de validação é considerado específico quando consegue identificar/quantificar os princípios ativos de uma formulação sem qualquer interferência dos produtos de degradação, impurezas do processo, excipientes ou outras impurezas potenciais (BRASIL, 2003). Os ensaios de especificidade foram realizados com o intuito de verificar se houve interferência nos sinais obtidos entre a HCTZ, o  $\beta$ CD e o colato de sódio, e seus produtos de degradação.

Ensaio de degradação forçada são uma ótima ferramenta para a identificação de possíveis impurezas, suas vias de obtenção e estabilidade intrínseca da molécula, sendo assim um importante indicador de estabilidade (JAIN, 2013). Os ensaios de degradação ácida, básica, oxidativa e neutra, bem como a degradação fotolítica foram realizados neste trabalho. Os cromatogramas dos ensaios de degradação forçada são mostrados na figura 8. A hidrólise básica mostrou uma diminuição da área da HCTZ em 16,42%. A formação de DSA foi observada (figura 8B), o que corrobora a informação da literatura, de que a formação deste produto de degradação ocorre por hidrólise irreversível, tanto em meio ácido como em meio alcalino, atingindo um máximo de degradação em pH 7,2 e um mínimo em pH 2,2 (DEVENTER *et al*, 2009; HERTZOG *et al*, 2002; MOLLICA *et al*, 1969; MOLLICA *et al*, 1971). A hidrólise ácida também mostrou diminuição da área da HCTZ (15,85%) e foi observada a formação de DSA (figura 8C). Nos ensaios neutros/térmico, observou-se uma grande degradação da HCTZ, verificada pela diminuição na área do cromatograma. Novamente, o DSA foi formado, apresentando um pico mais elevado (figura 8D), o que sugere que a maior parte da HCTZ foi convertida neste produto de degradação, com redução na área do pico de 51,15%. Esta degradação foi superior à obtida nas hidrólises ácida e básica e pode ser explicada pelo meio aquoso onde a amostra foi diluída, visto que a água pura possui um pH que oscila entre 5,8 e 6,2, valores estes que correspondem ao máximo de degradação do fármaco. A degradação oxidativa foi a única a apresentar a formação da impureza de processo conhecida como CTZ (figura 8E), corroborando os dados da literatura que afirmam que este composto se forma somente através de reações de oxidação (DEVENTER *et al*, 2009; HERTZOG *et al*, 2002; MOLLICA *et al*, 1969;

MOLLICA *et al.*, 1971). Também foi observada a formação de DSA, devido ao meio aquoso utilizado para a degradação. Um pico adicional foi detectado em aproximadamente de 2 minutos, proveniente do peróxido de hidrogênio utilizado para gerar a reação de oxidação. A degradação fotolítica mostrou uma pequena diminuição da área da HCTZ em ambas as radiações, fluorescente (figura 8F) e UV (figura 8G). As figuras 8H e 8I representam respectivamente a injeção do colato de sódio e  $\beta$ CD, e não foi observada eluição no tempo da HCTZ.

Figura 8: Cromatogramas obtidos nos ensaios de especificidade



Onde: **A** – HCTZ (padrão); **B** – hidrólise básica (NaOH 1M); **C** – hidrólise ácida (HCl 1M); **D** – hidrólise térmica (H<sub>2</sub>O, 80 °C); **E** – degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%); **F** – degradação fotolítica (luz fluorescente, 16 dias); **G** – degradação fotolítica (luz UV, 48 h); **H** – colato de sódio hidratado; **I** -  $\beta$ CD.

Em seu trabalho, HERTZOG *et al* (2002) identificaram o DSA e a CTZ como produtos de degradação. Há alguma controvérsia sobre a formação dos produtos de degradação para a HCTZ e estudos propuseram que o principal composto formado em condições de stress seria a CTZ (TAGLIARI, 2008), e que a mesma é considerada uma impureza de processo, um contaminante sintético ou um produto de degradação (SANGOI, 2013). No presente trabalho, a principal impureza

identificada foi o DSA, e observou-se que a degradação é mais provável de ocorrer em valores de pH que estão próximos de um valor neutro, atingindo um máximo a degradação 7,2 (LUSINA, 2005). Isso foi verificado por MENDES, (2013), que alcançou grande melhoria da estabilidade química em soluções pediátricas de HCTZ quando as mesmas tiveram seu pH reduzido de 6,5 para 3,3. Por estas razões, neste trabalho, o pH foi ajustado para 3, minimizando, assim, a degradação.

#### **4.1.1.2 Linearidade**

A linearidade é o parâmetro da validação que indica o grau de proporcionalidade entre o sinal analítico obtido e a concentração teórica da amostra (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O valor do coeficiente de correlação obtido deve ser de no mínimo 0,99 para que o método tenha linearidade aceitável dentro de uma faixa conhecida. Para verificar a relação entre a concentração da amostra e a resposta do instrumento, a linearidade foi estabelecida através da construção de 3 curvas analíticas para cada amostra – HCTZ, DSA e CTZ. O intervalo de concentrações adotado para a HCTZ foi 0,16, 1, 5, 10, 15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , e para este intervalo a equação da reta obtida foi  $y = 32430x - 3535,4$  e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9997. Para o produto de degradação DSA, o intervalo de concentrações estabelecido foi 0,1, 0,5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , a equação da reta obtida foi  $y = 47010x - 524,63$ , e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9999. Para a impureza de processo CTZ, o intervalo de concentrações estabelecido foi 0,1, 0,5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , a equação da reta obtida foi  $y = 15629x - 625,5$  e o coeficiente de correlação foi igual a 0,9999. Desta forma é possível afirmar que o método é linear na faixa de trabalho estabelecida, ou seja, o sinal analítico é diretamente proporcional a concentração do analito. A linearidade das curvas de calibração foi verificada por análise de variância (ANOVA), mostrando uma regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo tanto para a HCTZ como para seus produtos de degradação ( $p(5\%) = 2,96$  para a HCTZ, 3,26 para o DSA e 3,71 para a CTZ). As figuras 9, 10 e 11 demonstram graficamente a linearidade das três amostras.

Figura 9: Representação gráfica da curva analítica para a Hidroclorotiazida obtida por CLAE

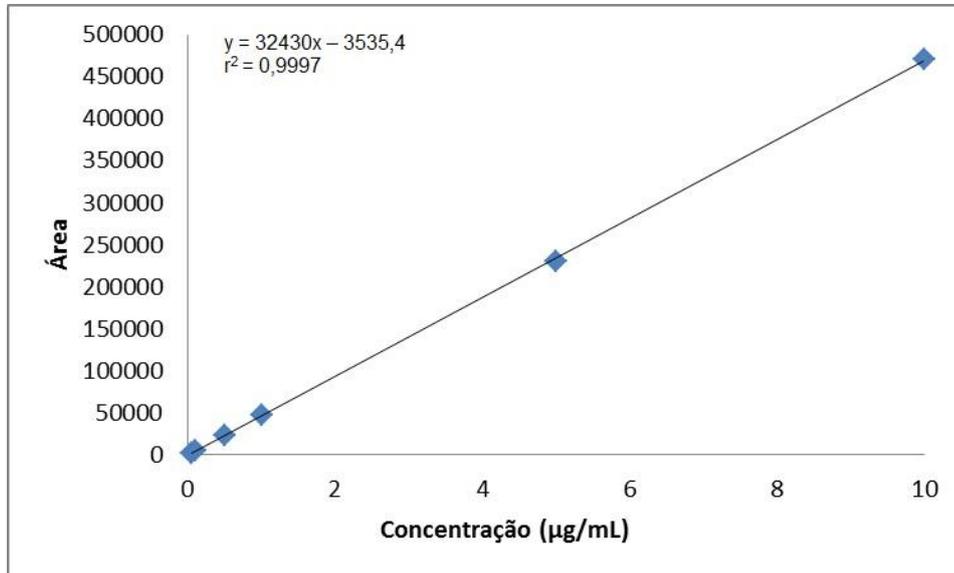


Figura 10: Representação gráfica da curva analítica para o Aminobenzeno obtida por CLAE

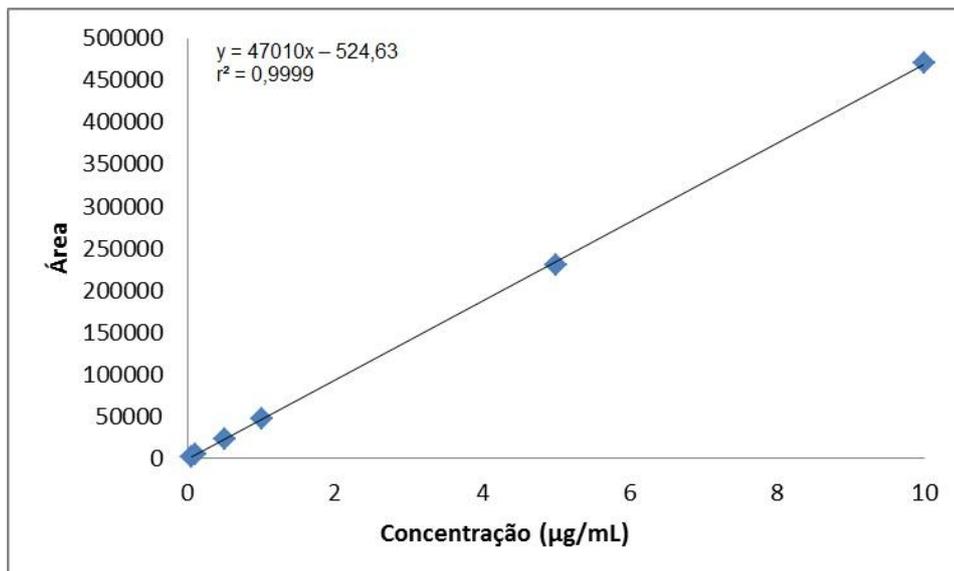
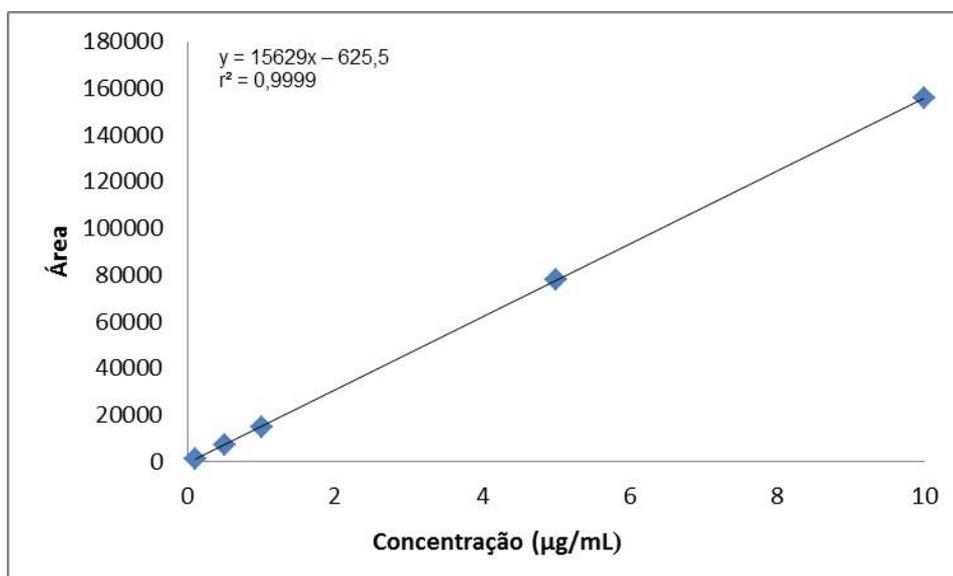


Figura 11: Representação gráfica da curva analítica para a Clorotiazida obtida por CLAE



#### 4.1.1.3 Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção são, respectivamente, a menor concentração em que o analito pode ser quantificado e a menor concentração em que o analito pode ser detectado, respectivamente (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Com a linearidade do método devidamente estabelecida, os limites de quantificação e detecção foram estabelecidos através da curva analítica, levando-se em conta o desvio padrão do intercepto e a média da inclinação de três curvas-padrão através das equações 2 e 3. A tabela 3 demonstra os valores obtidos para ambos os limites, e os valores calculados foram comprovados experimentalmente.

Tabela 2: Limites de detecção e quantificação para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida

Analito	Limite de detecção	Limite de quantificação
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
HCTZ	0,14	0,43
DSA	0,03	0,10
CTZ	0,06	0,19

#### 4.1.1.4 Precisão

Segundo a ANVISA, “A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra” (BRASIL, 2003). No presente estudo, a precisão foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária (inter-dia e inter-analistas). Para o ensaio de repetibilidade, soluções foram preparadas nas concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$  para a HCTZ e 1  $\mu\text{g/mL}$  para seus produtos de degradação. Analisou-se o coeficiente de variação de seis replicatas para cada analito e verificou-se que os mesmos mantiveram-se abaixo de 5%, assegurando precisão ao método. Os resultados para a repetibilidade são demonstrados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados dos ensaios de repetibilidade para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida

Amostra	Teor (%)		
	HCTZ	DSA	CTZ
1	98,17	100,69	97,50
2	98,36	100,39	98,34
3	97,58	101,36	99,16
4	98,80	100,44	99,48
5	98,85	101,27	98,54
6	97,40	100,77	97,34
Média	98,19	100,70	98,39
CV%	0,61	0,44	0,87

A precisão intermediária consiste em verificar se um método analítico fornece resultados precisos quando submetidos à diferentes condições laboratoriais, tais como analistas diferentes ou dias diferentes (ICH, 2005). A precisão intermediária do método foi avaliada através da análise de amostras com concentrações de 10 µg/mL para a HCTZ e 1 µg/mL para o DSA e a CTZ, realizadas por analistas diferentes, em um mesmo dia. As tabelas 4 e 5 demonstram os valores encontrados nos ensaios de precisão intermediária (inter-analistas) e ensaios inter-dias, respectivamente.

Tabela 4: Resultados dos ensaios de precisão intermediária (inter-analistas) para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida

Analista	Teor (%)		
	HCTZ	DSA	CTZ
1	99,06	100,69	98,42
2	98,53	99,29	98,31
3	99,19	99,39	99,60
Média	98,93	99,79	98,78
CV%	0,35	0,78	0,72

Tabela 5: Resultados dos ensaios de precisão intermediária (inter-dias) para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida

Dia	Teor (%)		
	HCTZ	DSA	CTZ
1	99,63	99,68	99,15
2	99,81	100,12	98,89
3	99,17	99,62	98,66
Média	99,53	99,81	98,90
CV%	0,41	0,53	0,69

#### 4.1.1.5 Exatidão

A exatidão é a capacidade de um método analítico em fornecer resultados próximos de um valor real conhecido (BRASIL, 2003; ICH, 2005). No experimento em questão, exatidão foi avaliada a partir de três soluções padrão diferentes, que continham 12, 15 e 18  $\mu\text{g/mL}$  para a HCTZ e 0,8, 1 e 1,2  $\mu\text{g/mL}$  para o DSA e CTZ, representando 80, 100 e 120% da concentração de análise respectivamente. A recuperação foi de 11,74 - 14,46 e 17,97  $\mu\text{g/mL}$  para a HCTZ, 0,79 - 1,04 e 1,22  $\mu\text{g/mL}$  para o DSA e 0,78 - 1,01 e 1,22  $\mu\text{g/mL}$  para a CTZ. Estes valores demonstram que o método é exato no intervalo proposto, como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Resultados dos ensaios de exatidão para a hidroclorotiazida, aminobenzeno e clorotiazida

Concentração teórica	Recuperação média % (CV%)		
	HCTZ	DSA	CTZ
80%	97,87(0,38)	98,75 (0,72)	97,13 (2,91)
100%	96,40 (3,55)	103,08 (0,86)	100,56 (0,96)
120%	99,83 (0,47)	102,04 (1,55)	102,15 (0,70)

#### 4.1.1.6 Robustez

No processo de validação, a robustez avalia a influência de pequenas mudanças em seus parâmetros, tais como composição da fase móvel, alteração do pH ou a temperatura da coluna (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Para o presente estudo, as condições alteradas foram o pH da fase móvel, o fluxo, e a temperatura da coluna. Os percentuais de recuperação, bem como seus valores de RSD (%) para cada condição alterada estão dispostos nas tabelas 7, 8 e 9:

Tabela 7: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da hidroclorotiazida por CLAE.

Variável	Faixa investigada	Teor (%)	CV (%)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,9	98,00	0,27
	1,0	100,20	0,05
	1,1	101,80	0,31
Temperatura (°C)	38	100,13	0,41
	40	100,20	0,05
	42	100,40	0,04
pH da fase móvel	2,9	99,30	0,56
	3,0	100,20	0,05
	3,1	99,70	0,74

Tabela 8: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do aminobenzeno por CLAE.

Variável	Faixa investigada	Teor (%)	CV (%)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,9	100,01	1,13
	1,0	98,57	0,46
	1,1	100,14	1,27
Temperatura (°C)	38	99,50	0,46
	40	98,57	0,46
	42	99,70	0,13
pH da fase móvel	2,9	97,40	1,39
	3,0	98,57	0,46
	3,1	98,00	1,06

Tabela 9: Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise da clorotiazida por CLAE.

Variável	Faixa investigada	Teor (%)	CV (%)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,9	99,12	0,44
	1,0	100,70	0,76
	1,1	98,95	0,50
Temperatura (°C)	38	99,90	1,84
	40	100,70	0,76
	42	101,40	0,76
pH da fase móvel	2,9	95,50	1,76
	3,0	100,70	0,76
	3,1	97,60	1,56

De acordo com os dados apresentados, as percentagens de recuperação mantiveram-se na faixa entre 95 e 105%, e os valores de coeficiente de variação não ultrapassaram o 5%, demonstrando-se que o método é robusto dentro da faixa de alterações proposta.

#### 4.1.1.7 Aplicabilidade do método

O fármaco puro, quando exposto a radiação demonstrou pouca degradação, tanto no espectro visível (8,77%) quanto no UV (8,78%). As misturas físicas contendo HCTZ:  $\beta$ CD também apresentaram eventos de degradação limitados. A mistura física contendo o colato não apresentou eventos de degradação significativos, em ambos os tipos de luz utilizados. Em relação aos complexos, também não foram observados efeitos de degradação significantes, sugerindo uma proteção fotolítica exercida pela complexação da HCTZ. Na mistura física entre o colato e a  $\beta$ CD, nenhum pico relevante foi visualizado. A literatura aponta a formação de dissulfonamida através da hidrólise induzida pela luz (CIBOROWSKI, 2004), fato este comprovado pela formação de DSA nos ensaios de fotoestabilidade. Através dos dados obtidos é possível constatar que a complexação da HCTZ, além de melhorar a dissolução e solubilidade, também promove proteção contra a degradação fotolítica. A tabela 10 sumariza os resultados dos testes de

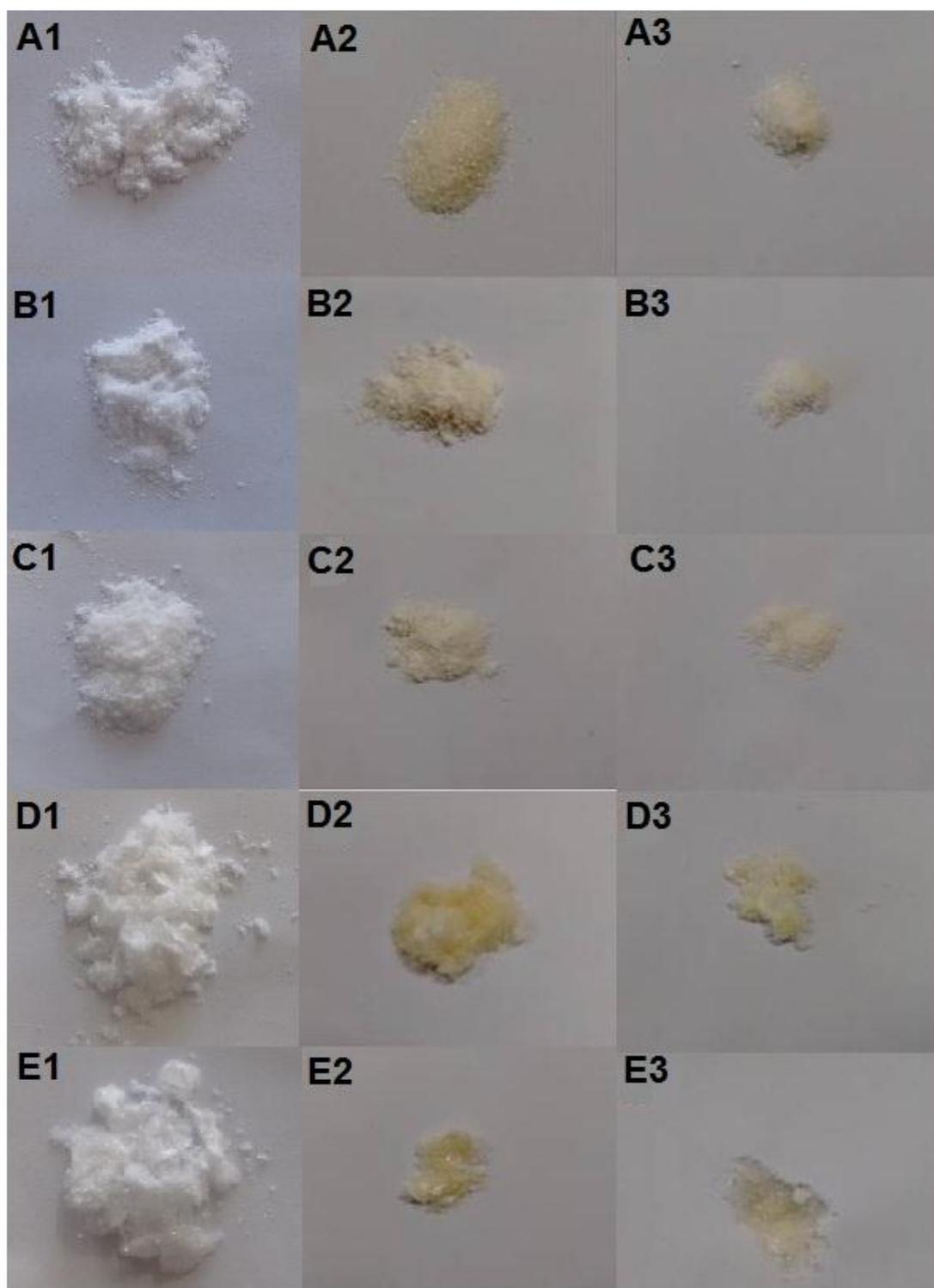
fotoestabilidade.

Tabela 10: Resultados do ensaio de fotoestabilidade

Amostra	Teor %	
	Luz fluorescente	Luz UV
HCTZ pura	91,23	91,22
M.F H $\beta$	89,11	89,78
M.F H $\beta$ C	93,12	92,24
COMP H $\beta$	100,03	100,30
COMP H $\beta$ C	99,87	99,93
M.F $\beta$ C	---	---

A figura 12 demonstra as alterações visuais observadas nas amostras após a exposição à luz fluorescente por 16 dias (A) e UV por 48 horas (B).

Figura 12: Alterações visuais provenientes do ensaio de fotoestabilidade



Onde: **A1** – HCTZ pura (padrão); **A2** – HCTZ pura (luz fluorescente); **A3** – HCTZ pura (luz UV); **B1** – MF entre  $\beta$ -CD e HCTZ (padrão); **B2** – MF entre  $\beta$ -CD e HCTZ (luz fluorescente); **B3** – MF entre  $\beta$ -CD e HCTZ (luz UV); **C1** – MF entre  $\beta$ -CD, HCTZ e COL (padrão); **C2** – MF entre  $\beta$ -CD, HCTZ e COL (luz fluorescente); **C3** – MF entre  $\beta$ -CD, HCTZ e COL (luz UV); **D1** – Complexo H $\beta$  (padrão); **D2** – Complexo H $\beta$  (luz fluorescente); **D3** – Complexo H $\beta$  (luz UV); **E1** – Complexo H $\beta$ C (padrão); **E2** – Complexo H $\beta$ C (luz fluorescente); **E3** – Complexo H $\beta$ C (luz UV).

Pode-se observar que a HCTZ pura não demonstrou alterações visuais significativas após ser exposta à luz fluorescente (figura 12A2) e à luz UV (figura 12A3). Houve mínima alteração de cor devido a análise ter sido efetuada com amostras no estado sólido, o que diminui a formação de DSA, visto que o mesmo necessita de meio aquoso para formar-se através de hidrólise. As análises correspondentes à mistura física entre a  $\beta$ CD e HCTZ na fluorescente (figura 12B2) e UV (figura 12B3) e  $\beta$ CD, HCTZ e colato (figuras 12C2 e 12C3) também não apontaram alterações significantes.

As amostras 12D2 (luz fluorescente) e 12D3 (luz UV), referentes aos complexos contendo apenas  $\beta$ -CD e HCTZ, apresentaram mudanças em sua coloração. Já nos complexos contendo o colato de sódio (figuras 12E1 e 12E3) também foram observadas alterações visuais nas amostras. Estas porém foram menos evidentes que as encontradas nos complexos sem o colato, sugerindo uma maior proteção fotolítica para os complexos produzidos com o mesmo.

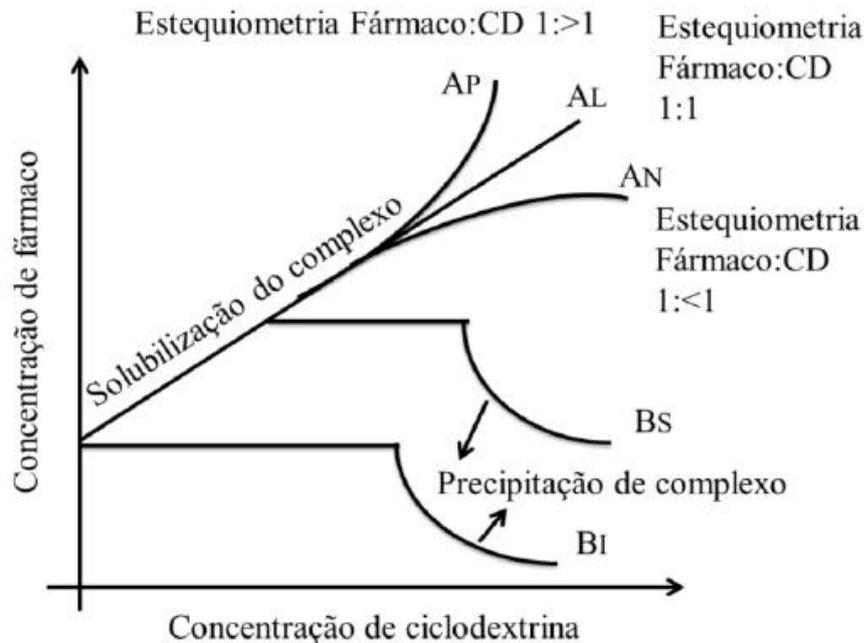
## 4.2 Estudo de solubilidade de fases

Para a verificação da formação dos complexos de inclusão, vários procedimentos podem ser adotados. Dentre eles podem-se citar as técnicas físico-químicas de caracterização, como análise térmica, difração de raios-x, espectrometria na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, e como procedimento inicial os ensaios de solubilidade de fases (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; LOFTSSON *et al.*, 2007).

A formação de complexos de inclusão foi classificada por Higuchi e Connors (1965), levando-se em conta a concentração do ligante ( $\beta$ CD) em relação à solubilização do fármaco (substrato), formando assim o perfil de solubilidade de fases. Estes perfis podem ser classificados de acordo com a curva formada, como demonstrado na figura 13. Quando o complexo formado entre o ligante e o substrato é de primeira ordem, obtém-se uma curva do tipo A<sub>L</sub>. Se a formação do complexo for de primeira ordem em relação ao substrato e de segunda ordem em relação ao ligante, a curva obtida representará um perfil de solubilidade denominado A<sub>P</sub>. Quando o substrato apresenta problemas em sua solubilização em concentrações maiores, ou quando há agregação dos complexos, obtém-se um perfil de solubilidade do tipo A<sub>N</sub>. Já o perfil do tipo B é obtido quando a solubilidade do substrato é influenciada pelo ligante até certo ponto, atingindo seu ponto de saturação em determinada concentração e possuindo solubilidade limitada para complexação. Seu subtipo B<sub>s</sub> é caracterizado por solubilidade aquosa limitada, onde a adição de mais ligante provoca conseqüente precipitação de complexo insolúvel. Por fim, o subtipo B<sub>i</sub> comporta-se de maneira semelhante ao B<sub>s</sub>, porém o complexo formado é tão insolúvel que não se consegue mensurar o aumento inicial da concentração do fármaco (HIGUCHI; CONNORS, 1965; TAKAHASHI, ANDREA IKEDA; VEIGA, FRANCISCO JOSÉ BAPTISTA; FERRAZ, HUMBERTO GOMES, 2012).

Figura 13: Tipos de diagramas de solubilidade de fase obtidos da formação de complexos de inclusão entre fármacos e CD.

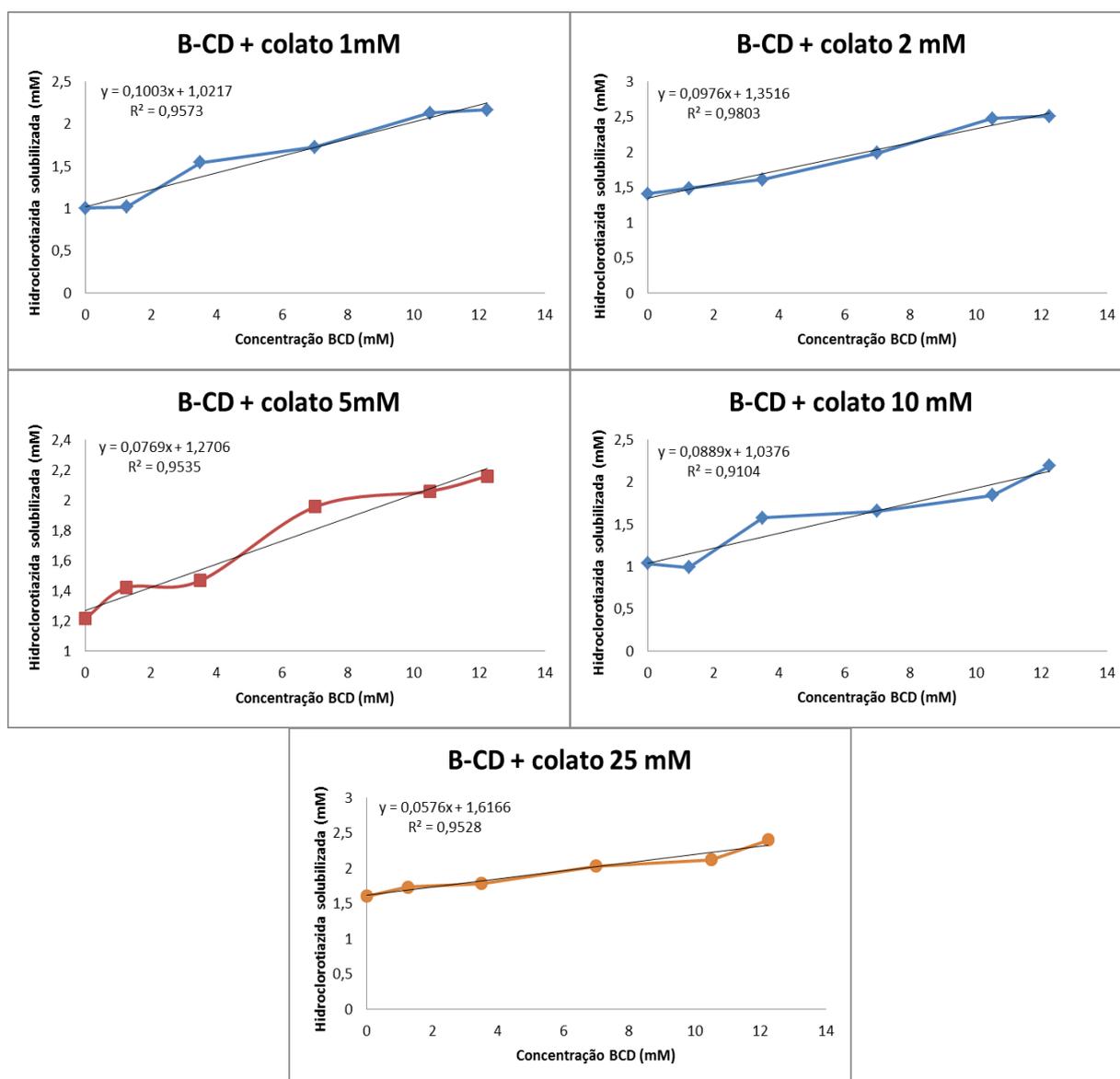
Fonte: Adaptado de Takahashi, 2012.



O presente ensaio de solubilidade teve como objetivo avaliar o perfil de solubilidade da HCTZ mediante adição de concentrações crescentes de  $\beta$ CD, e na presença do colato de sódio hidratado. Várias concentrações de colato foram testadas (1, 2, 5, 10 e 25 mM), e a que apresentou maior solubilização do fármaco foi a concentração de 2 mM ( $r^2 = 0,9803$ ;  $y = 0,0976X + 1,3516$ ). Além disso, todas as curvas obtidas apresentaram perfil de solubilidade AL, ou seja, o processo acontece através de uma reação de primeira ordem, e a complexação do substrato é proporcional à concentração do ligante adicionado. Os valores obtidos para a constante de estabilidade ( $K_c$ ), mantiveram-se abaixo de 1, indicando desta forma que os complexos de inclusão formados possuem de fato estequiometria de 1:1 (M:M). O valor de pH utilizado (3,3) foi estabelecido levando-se em conta a rápida degradação da HCTZ em valores de pH próximos de 7, que acontece via hidrólise irreversível (DEVENTER *et al.*, 2009; HERTZOG *et al.*, 2002; MOLLICA *et al.*, 1969; MOLLICA *et al.*, 1971). A diminuição do pH também interfere diretamente no processo de complexação, visto que a quantidade de fármaco não-ionizado é muito maior em valores de pH baixos, proporcionando condições mais adequadas à

complexação, devido à característica apolar da cavidade da  $\beta$ CD. Este valor foi selecionado também pelo fato da  $\beta$ CD sofrer hidrólise em valores de pH muito baixos (MIRANDA *et al*, 2011). A figura 14 demonstra os perfis de solubilidade obtidos em diferentes concentrações de colato de sódio:

Figura 14: Perfis de solubilidade de fases obtidos para HCTZ:  $\beta$ CD em diferentes concentrações de colato de sódio:



Os valores obtidos para solubilidade aquosa intrínseca do fármaco ( $S_0$ ), solubilidade máxima antes de atingir a saturação ( $S_{max}$ ), constante de estabilidade ( $K_c$ ) e eficiência de solubilização (ES) estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11: Resultados do ensaio de solubilidade de fases para HCTZ:  $\beta$ CD mediante adiç3o de diferentes concentraç3es de colato de s3dio:

Sistema	Concentraç3o de colato (mM)	Kc (M <sup>-1</sup> )	S <sub>0</sub> (mg/mL)	S <sub>max</sub> (mg/mL)	ES (S <sub>max</sub> /S <sub>0</sub> )
HCTZ: $\beta$ CD	1	54,80	0,31	0,63	2,03
HCTZ: $\beta$ CD	2	38,54	0,42	0,77	1,84
HCTZ: $\beta$ CD	5	58,43	0,36	0,64	1,78
HCTZ: $\beta$ CD	10	78,14	0,33	0,63	1,90
HCTZ: $\beta$ CD	25	33,78	0,48	0,71	1,48

Onde: Kc – Constante de estabilidade aparente; S<sub>0</sub> – solubilidade inicial; S<sub>max</sub> – Solubilidade m3xima; ES – Efici3ncia de solubilizaç3o

De acordo com os dados apresentados, 3 poss3vel constatar que a concentraç3o de 2 mM obteve o melhor perfil de solubilidade, raz3o pela qual esta concentraç3o foi utilizada na preparaç3o dos complexos de inclus3o. Apesar de n3o ter obtido os melhores resultados de efici3ncia de solubilizaç3o (1,84), obteve o maior valor de solubilidade m3xima, o qui reflete diretamente na absorç3o do f3rmaco. O valor de r<sup>2</sup> (0,9803) tamb3m foi utilizado como par3metro de escolha, pois quanto mais linear a curva, mais HCTZ estar3 complexada de acordo com a adiç3o do ligante, o que indica formaç3o de uma curva do tipo A<sub>L</sub> (estequiometria de 1:1, reaç3o de primeira ordem)..

### 4.3 Caracterizaç3o f3sico-qu3mica da mat3ria-prima

Com o objetivo de avaliar os aspectos f3sico-qu3micos da HCTZ, foram realizados procedimentos para caracterizaç3o f3sico-qu3mica no estado s3lido. Os procedimentos realizados foram an3lise t3rmica, atrav3s de Calorimetria Explorat3ria Diferencial, Termogravimetria e Espectroscopia na regi3o do infravermelho com transformada de Fourier.

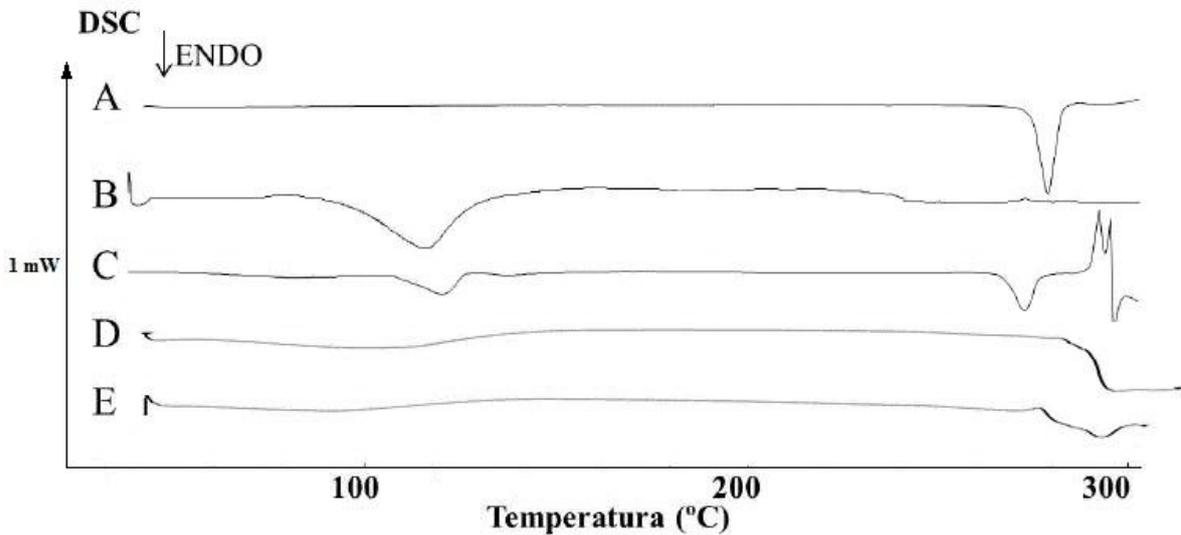
#### 4.3.1 Calorimetria explorat3ria diferencial (DSC)

A DSC 3 uma t3cnica amplamente utilizada para a avaliaç3o de sistemas bin3rios, tais como complexos de inclus3o, devido 3 pouca amostra necess3ria para a an3lise, e 3 rapidez dos resultados (GIORDANO; NOVAK; MOYANO, 2001). A

figura 15 demonstra as endotermas obtidas para a HCTZ,  $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão. O endoterma obtido para HCTZ (figura 15A) demonstra evento de fusão em 265,17 °C ( $\Delta H_{\text{fusão}} = - 123,38 \text{ J/g}$ ). Já o obtido para a  $\beta$ CD (figura 15B) revela um evento endotérmico em 115,58 °C, efeito este proveniente da evaporação das moléculas de água contidas na cavidade da  $\beta$ CD. Para a comprovação deste efeito, a amostra foi aquecida primeiramente até 200 °C, para que houvesse o total desprendimento das moléculas de água presentes. Após este primeiro ciclo de aquecimento, a amostra foi resfriada e submetida à um segundo ciclo, desta vez até 300 °C e não se observou o evento endotérmico, comprovando que o mesmo se deu pela evaporação das moléculas de água da  $\beta$ CD (figura 16). Já a curva obtida para a mistura física (1:1; m/m) apresentou dois eventos endotérmicos, um em 114,32 °C e outro em 262,3 °C (figura 15C). A ligeira diferença observada entre os pontos de fusão da HCTZ pura e da mistura física deve-se a um evento de complexação leve entre a HCTZ e a  $\beta$ CD, devido à solubilização do fármaco na cavidade da  $\beta$ CD em função do aquecimento, como já observado por Li e colaboradores e Delrivo e colaboradores (LI *et al.*, 2005; DELRIVO; ZOPPI; LONGHI, 2011).

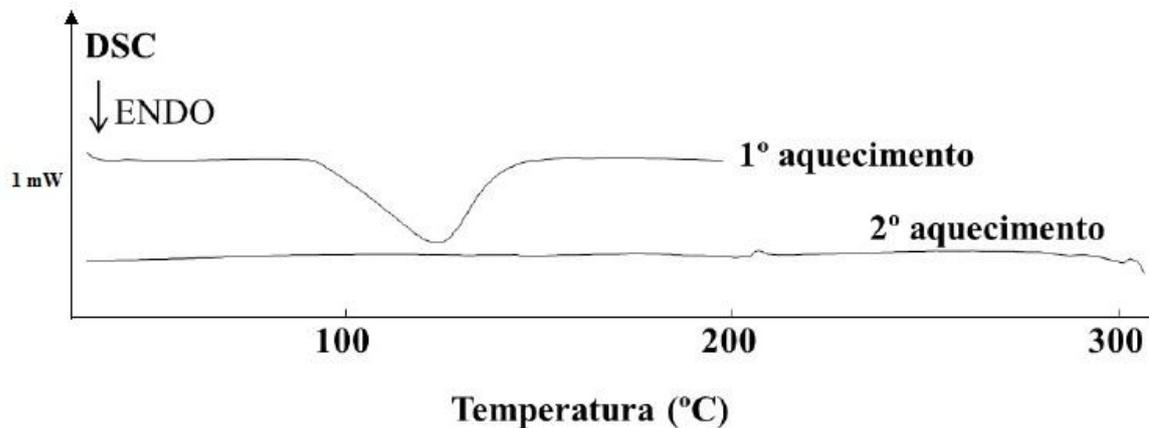
No que se refere aos complexos de inclusão, não foi observada a endoterma de fusão para a HCTZ (figuras 15D e 15E). Isto pode ser explicado pelo adentramento total ou parcial do fármaco na cavidade da  $\beta$ CD e pelo processo de liofilização, que resulta na amorfização da amostra.

Figura 15: Entotermas obtidas através de DSC para HCTZ,  $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão.



Onde: **A** – HCTZ pura; **B** –  $\beta$ CD; **C** – Mistura física; **D** – Complexo H $\beta$ ; **E** – Complexo H $\beta$ C

Figura 16: Curva de DSC obtida para  $\beta$ CD. 1º aquecimento: 30 a 200 °C, 2º aquecimento: 30 a 300 °C.



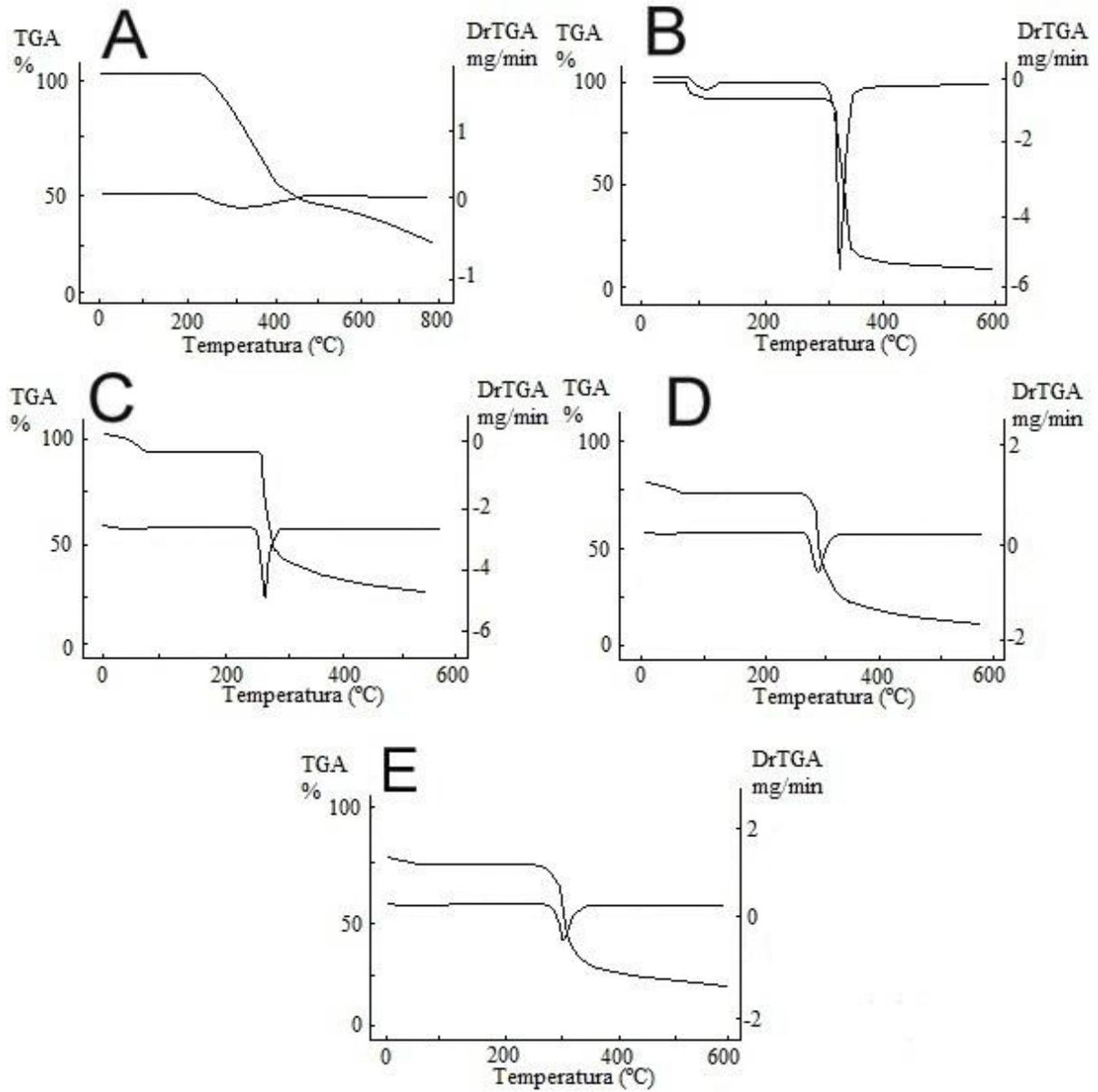
#### 4.3.2 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é uma técnica analítica utilizada em conjunto com a DSC para caracterização térmica de um composto. Análises termogravimétricas foram realizadas para HCTZ pura,  $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão, como demonstrado na figura 17. Para a HCTZ pura (figura 17A), observou-se um evento

de perda de massa (58,77%) em aproximadamente 366° C, indicando que o fármaco se decompõe nesta temperatura. Já a  $\beta$ CD (figura 17B) apresentou evento de perda de massa (76,55%) próximo a 349,7° C. A perda de massa observada em 105° C é relacionada à perda de moléculas de água pela  $\beta$ CD, totalizando 9% como descrito na laudo do fabricante. A mistura física (figura 17C) demonstrou interação entre a HCTZ e  $\beta$ CD, visto que a quantidade de água perdida pela  $\beta$ CD diminuiu de 9% para 7%, e um evento de degradação foi observado em aproximadamente 310° C.

Nos complexos de inclusão (figura 17D e figura 17E) observou-se uma melhora da estabilidade térmica do fármaco quando comparado à sua mistura física, apresentando evento de degradação em aproximadamente 320° C. Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que a complexação da HCTZ com a  $\beta$ CD alterou a estabilidade térmica da mesma.

Figura 17: Curvas termogravimétricas obtidas para a HCTZ,  $\beta$ CD e complexos de inclusão



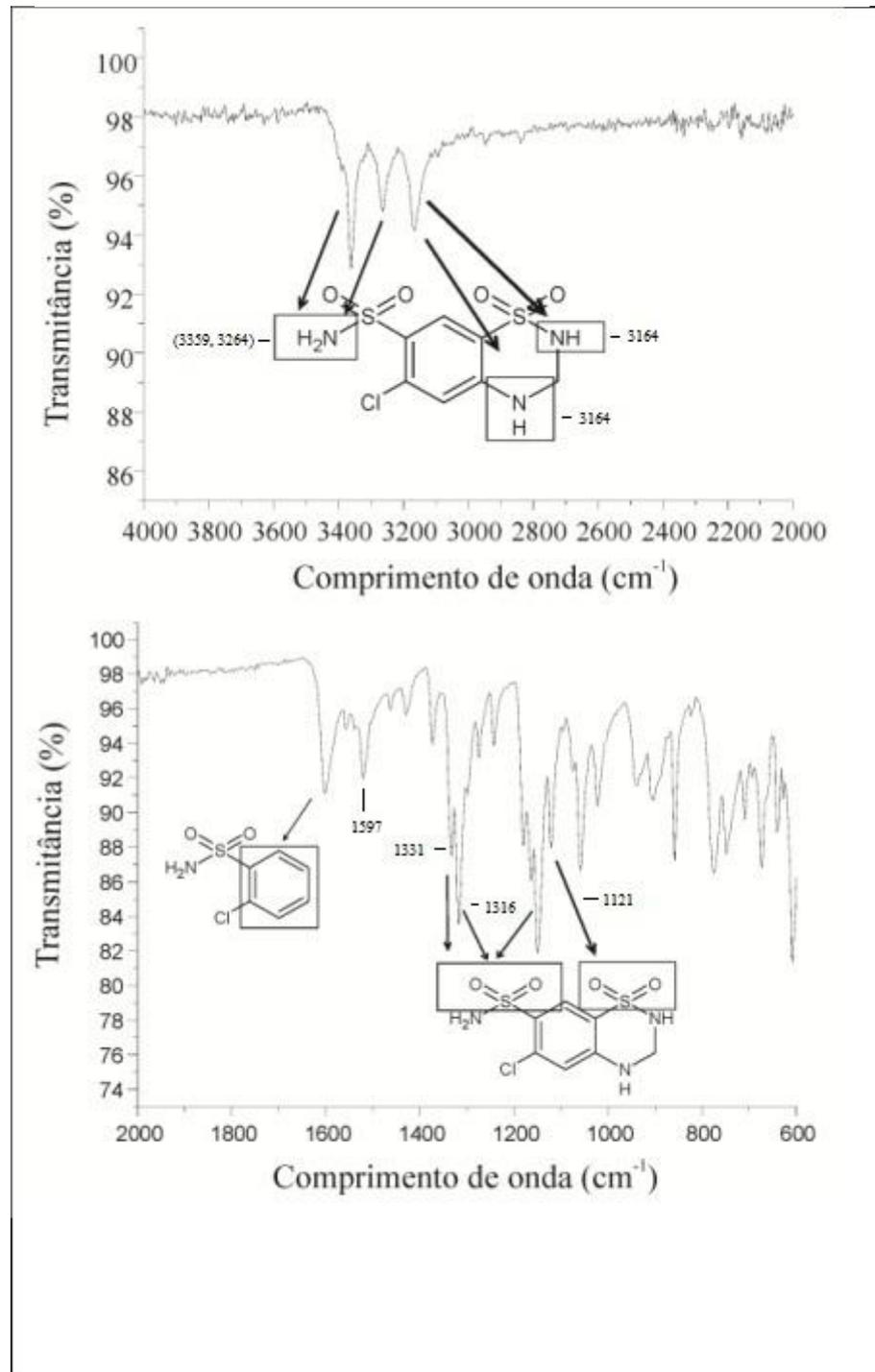
Onde: **A** – HCTZ pura; **B** –  $\beta$ CD; **C** – Mistura física; **D** – Complexo H $\beta$ ; **E** – Complexo H $\beta$ C

### 4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier é uma metodologia analítica muito utilizada no processo de caracterização de uma molécula. Esta técnica é especialmente útil na caracterização dos complexos de inclusão e pode fornecer informações sobre possíveis interações entre a molécula-hóspede e a  $\beta$ CD (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Através desta técnica analítica, foi possível identificar as bandas características da HCTZ, como demonstrado na figura 18. No espectro a banda observada em  $1121\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupo  $\text{SO}_2$  do anel heterocíclico, e as bandas em  $1316\text{ cm}^{-1}$  e  $1331\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupamentos  $\text{SO}_2$  da sulfonamida. A banda encontrada em  $1597\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao efeito de sobreposição das bandas de ligações  $\text{C}=\text{C}$  do anel benzênico e ligações  $\text{C}-\text{N}$ , sendo esta mais uma banda característica da HCTZ. As bandas observadas em  $3359\text{ cm}^{-1}$ ,  $3264\text{ cm}^{-1}$  e  $3164\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de deformação axial dos átomos de nitrogênio presentes na molécula. A banda em  $3164\text{ cm}^{-1}$  é causada pelas vibrações assimétricas do grupo  $\text{N}-\text{H}$  da sulfonamida primária. Já a banda em  $3264\text{ cm}^{-1}$  é causada pelas vibrações simétricas e, finalmente, a banda localizada em  $3359\text{ cm}^{-1}$  indica uma ligação  $\text{N}-\text{H}$  que pertence ao grupo amina secundária.

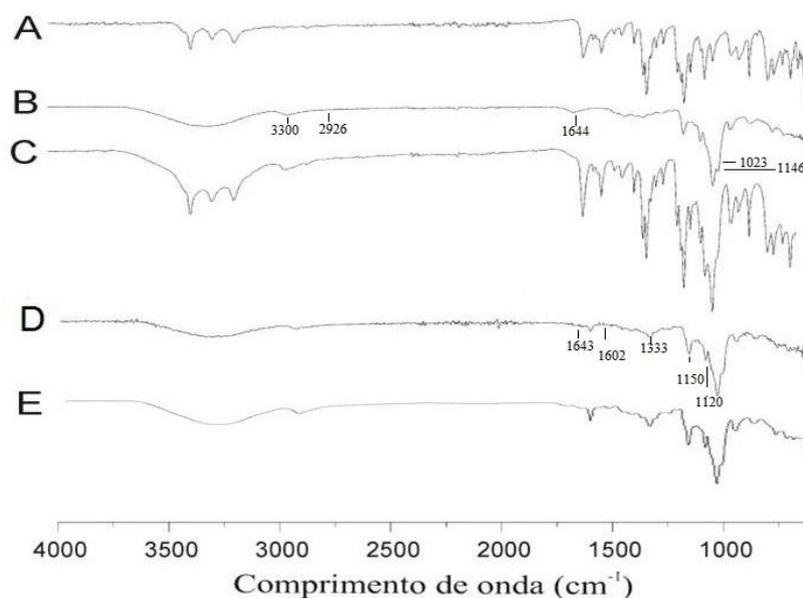
Figura 18: Espectro de absorção infravermelho obtido para a hidroclorotiazida



A figura 19 sumariza os espectros obtidos para a HCTZ,  $\beta$ CD, misturas físicas e complexos de inclusão. O espectro obtido para a  $\beta$ CD pura (figura 19B) revelou a presença de moléculas de água no interior de sua cavidade, evidenciado pela deformação observada nas ligações O-H que deram origem a banda característica em 1644  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas observadas em 1146  $\text{cm}^{-1}$  e 1023  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às

bandas do estiramento assimétrico de C-O-C, e entre 1500 – 1200  $\text{cm}^{-1}$  pode-se observar os modos de deformação dos grupos hidroxila no plano da  $\beta$ CD. Já em 2926  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se a banda de estiramento da ligação C-H, e em 3300  $\text{cm}^{-1}$  observa-se bandas relacionadas ao estiramento simétrico e assimétrico das hidroxilas presentes no exterior da  $\beta$ CD. O espectro obtido para a mistura física (figura 19C) corresponde à sobreposição das bandas principais da HCTZ e  $\beta$ CD. No complexo de inclusão HCTZ:  $\beta$ CD (figura 19D), a banda em 1120  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupo  $\text{SO}_2$  do anel heterocíclico desapareceu por completo, e a banda em 1602  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao anel benzênico da molécula sofreu uma pronunciada diminuição. Isto sugere que a porção heterocíclica e aromática da molécula foi quase totalmente inserida na cavidade da  $\beta$ CD. Já em 1150  $\text{cm}^{-1}$ , a banda intensa encontrada sugere que o grupamento  $\text{SO}_2$  da sulfonamida não está de fato incluído na cavidade da  $\beta$ CD. Em 1333  $\text{cm}^{-1}$  e 1320  $\text{cm}^{-1}$  ainda é possível observar as bandas referentes ao grupo  $\text{SO}_2$  da sulfonamida. Observou-se uma pronunciada diminuição da banda presente em 1643  $\text{cm}^{-1}$ , o que indica que a grande maioria das moléculas de água da  $\beta$ CD cedeu lugar à HCTZ. Não é possível distinguir as bandas de estiramento das ligações N-H devido ao fenômeno de sobreposição de banda da hidroxila da  $\beta$ CD acima de 3000  $\text{cm}^{-1}$ . O complexo contendo o colato de sódio (figura 19E) apresentou um perfil semelhante ao do complexo contendo somente a  $\beta$ CD.

Figura 19: Espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho para HCTZ,  $\beta$ CD, mistura física e complexos de inclusão



Onde: **A** – HCTZ pura; **B** –  $\beta$ CD; **C** – Mistura física; **D** – Complexo H $\beta$ ; **E** – Complexo H $\beta$ C

#### **4.4 Avaliação do perfil de dissolução**

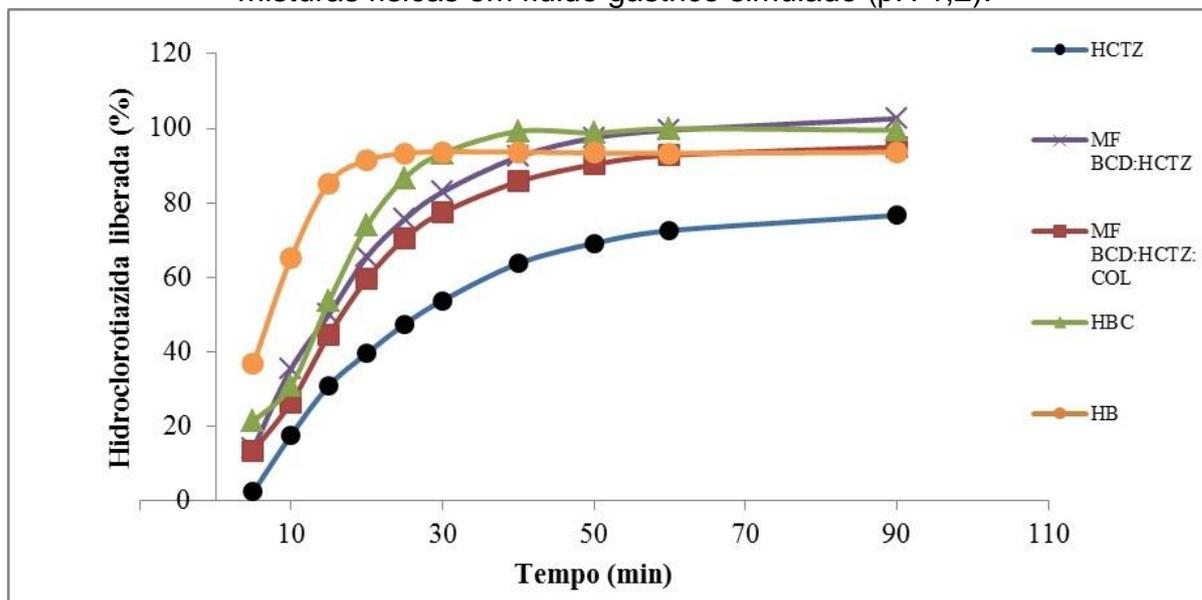
A HCTZ é um fármaco pertencente à classe IV do SCB, ou seja, apresenta baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade. Para exercer seu efeito, um fármaco deve estar dissolvido e solubilizado, para permear a membrana gastrointestinal e poder exercer o efeito terapêutico. No caso da classe IV, estes parâmetros estão diminuídos devido as características físico-químicas do fármaco, muitas vezes não gerando o efeito esperado (LIPINSKI, 2002; BUCKLEY *et al.*, 2012).

No presente estudo foram realizados diversos ensaios para avaliação do perfil de dissolução da HCTZ, de seus complexos de inclusão e de suas misturas físicas. Os experimentos foram realizados em fluido gástrico simulado (pH 1,2).

##### **4.4.1 Fluido gástrico simulado (FGS)**

Para que um fármaco seja absorvido de forma efetiva, é necessário que o mesmo esteja não-ionizado tanto quanto possível, pois a forma não-ionizada é mais apolar, e promove maior absorção pelas membranas plasmáticas (RANG, DALE, 2012). A HCTZ possui mínimo de degradação em pH abaixo de 2, e quase todo o fármaco está em sua forma não-ionizada neste valor, o que auxiliaria a dissolução da mesma em pH gástrico (1,2). Nos ensaios de dissolução em fluido gástrico simulado, vários perfis de dissolução foram obtidos, e os mesmo estão demonstrados na figura 20.

Figura 20: Perfis de dissolução obtidos para a HCTZ, complexos de inclusão e misturas físicas em fluido gástrico simulado (pH 1,2):



O perfil da HCTZ pura demonstrou no tempo de cinco minutos uma liberação de aproximadamente 2,34%, e um máximo de liberação de 76,64% em 90 minutos. Os perfis obtidos para ambas as misturas físicas ( $\beta$ CD:HCTZ e  $\beta$ CD:HCTZ:COL) foram semelhantes, e apresentaram uma maior liberação do fármaco quando comparados com a HCTZ pura. Isto corrobora o fato de que valores de pH baixos contribuem favoravelmente à interação do fármaco com a cavidade apolar das ciclodextrinas, e que este fenômeno se mostra mais pronunciado quando a molécula-hóspede se encontra em sua forma livre (não-ionizada) (VEIGA, *et al*, 1996).

Já os complexos de inclusão contendo  $\beta$ CD e HCTZ mostraram perfil de liberação do fármaco aumentado. Em aproximadamente cinco minutos, 36,69% do fármaco já havia sido liberado, atingindo um máximo de liberação de 93,59%. Estes resultados nos permitem afirmar que de fato a complexação com a  $\beta$ CD promove uma aumento considerável da solubilidade aquosa do fármaco, melhorando os parâmetros físico-químicos da HCTZ.

O perfil de dissolução obtido para o complexo de inclusão contendo  $\beta$ CD, HCTZ e colato de sódio apresentou características semelhantes às encontradas no perfil obtido para os complexos contendo apenas  $\beta$ CD e HCTZ, porém houve um pequeno atraso no início da liberação do fármaco. No perfil obtido pode-se observar que o complexo contendo o colato de sódio liberou, no tempo de cinco minutos,

aproximadamente 21,28% do fármaco, atingindo um máximo de liberação de 99,51% em 90 minutos. Apesar do complexo contendo o colato ter apresentado um atraso no início de sua liberação em relação ao complexo sem o colato, esta formulação teve maior liberação a partir de 40 minutos, mantendo este perfil até o final do experimento. O atraso na liberação do fármaco nos complexos contendo colato de sódio pode ser relacionado às características anfipáticas dos sais biliares, que possuem suas hidroxilas localizadas abaixo do equador de um esqueleto esteroideal planar. A orientação destes grupos hidroxila basicamente determina se ele será hidrofílico ou hidrofóbico (NASKAR, 2013), influenciando no início da liberação do fármaco. Na análise estatística, realizada através da aplicação do teste t de Student (bi-caudal, pareado), observou-se que mesmo o complexo contendo colato de sódio tendo apresentado uma maior porcentagem final de liberação do fármaco, esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p(5\%) = 0,13$ ). Porém, o uso de ácidos biliares como surfactantes pode ser uma alternativa no desenvolvimento e/ou aprimoramento de formas farmacêuticas contendo fármacos pertencentes à classe IV no SCB.

#### 4.5 Estudos de permeabilidade aparente

Os coeficientes de permeabilidade obtidos não foram significativamente diferentes entre si, indicando que o processo de permeabilidade intestinal passiva, já descrito para a HCTZ, não sofreu alteração pelo processo de complexação com ciclodextrinas (ANOVA/SNK,  $p > 0,05$ ), como demonstrado na tabela 12.

Tabela 12: Coeficientes de permeabilidade obtidos para HCTZ livre, H $\beta$ , H $\beta$ C e suas respectivas misturas físicas.

Papp (cm/s - 10 <sup>-7</sup> )					
Exp	HCTZ	H $\beta$	H $\beta$ C	MF H $\beta$	MF H $\beta$ C
1	4,37	2,54	2,61	7,61	4,49
2	9,21	5,82	6,95	8,16	5,68
Média	6,79	4,18	4,78	7,88	5,08
DP	3,42	2,32	3,07	0,39	0,84

Entretanto, quando verificados os índices totais de permeabilidade, pode-se notar um aumento da quantidade total permeada para o complexo de inclusão entre a HCTZ e a  $\beta$ CD, e um aumento ainda mais acentuado para o complexo com colato (tabela 13). Este fato deve-se provavelmente a presença de uma maior quantidade de HCTZ dissolvida no meio capaz de permear as células. Mesmo não influenciando de maneira significativa o coeficiente de permeabilidade do fármaco, observou-se um aumento significativo na solubilidade da HCTZ complexada com o colato, indicando que o mesmo possui uma ação sinérgica com a  $\beta$ CD, melhorando a solubilidade e conseqüentemente a permeabilidade total da HCTZ.

Tabela 13: Quantidade total permeada para para HCTZ livre, H $\beta$ , H $\beta$ C e suas respectivas misturas físicas

Quantidade total permeada ( $\mu$ g/mL)				
HCTZ	H $\beta$	H $\beta$ C	MF H $\beta$	MF H $\beta$ C
0,11	0,37	0,43	0,27	0,25

Adicionalmente, a incubação das monocamadas celulares com a ciclodextrina isolada, nas mesmas concentrações presentes nos complexos, não afetou a viabilidade e as propriedades de barreira das células, verificada através da avaliação da permeabilidade do marcador fluorescente “lucifer yellow”.

#### 4.6 Avaliação da diurese in-vivo

A HCTZ é um fármaco importante no tratamento da hipertensão arterial. Sua atividade farmacológica, baseada na inibição do co-transporte de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no túbulo distal, gera a diurese proveniente da excreção destes íons. Diuréticos tiazídicos possuem efeito terapêutico limitado, visto que normalmente há uma reabsorção de sódio de cerca de 5% e grande excreção de íons potássio ( $\text{K}^+$ ) (BRUNTON *et al.*, 2010; RANG *et al.*, 2012; SEAN and SWEETMAN, 2002). Com a melhoria observadas nos perfis de dissolução da HCTZ após complexação com a  $\beta$ CD com e sem adição de colato de sódio, e dada hipótese de que os complexos de inclusão teriam o potencial de melhorar as características de absorção do fármaco, foi realizado o ensaio *in-vivo* da HCTZ pura, complexos de inclusão contendo colato

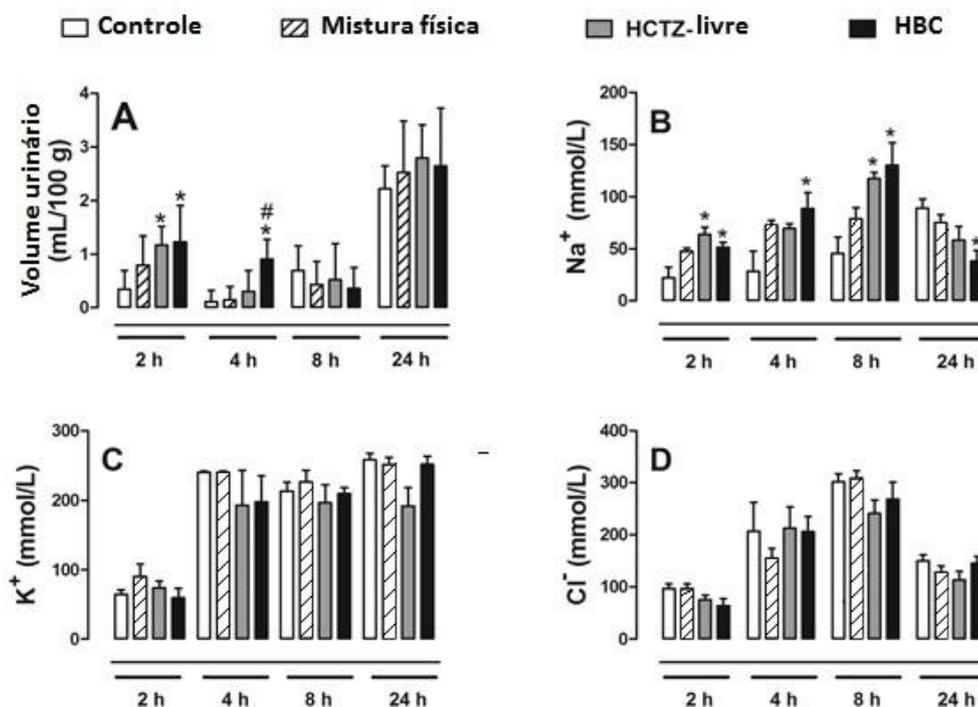
de sódio e suas respectivas misturas físicas. A diurese dos animais foi monitorada e avaliada para observar o efeito dos complexos de inclusão. A concentração eliminada de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  também foi avaliada, e comparada com a HCTZ pura e mistura física.

O volume urinário obtido em 2, 4, 8 e 24 horas após administração oral, juntamente com as concentrações eletrolíticas dos diferentes grupos é demonstrado na figura 21. Nenhuma diferença estatística foi observada entre a atividade terapêutica da HCTZ e da mistura física HCTZ: $\beta$ CD:COL. No que se refere à excreção urinária (figura 21A), os complexos de inclusão contendo o colato de sódio apresentaram em 2 horas perfil de excreção semelhante ao do fármaco em sua forma livre, porém ambos apresentaram significância estatística em relação ao grupo controle. Já em 4 horas, os complexos de inclusão obtiveram maior excreção urinária, apresentando significância em relação não só ao grupo controle, mas também em relação ao grupo tratado com o fármaco livre. Nos tempos de 8 e 24 horas, não foi observada alteração significativa. A excreção urinária observada no tempo de 4 horas para os complexos contendo o colato foi maior do que nos complexos sem o mesmo, demonstrando que esta formulação conseguiu manter a excreção urinária por mais tempo, através do aumento da permeabilidade da HCTZ. Tal fato também pode ser explicado pela ação inibitória dos sais biliares exercida sobre uma proteína chamada BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (STAUD, 2004; LAI, 2013). Tal proteína faz parte de um grupo conhecido como Transportadores ABC (ATP binding cassette) cuja função é o transporte de uma variada gama de substratos através do meio intracelular, tais como produtos metabólicos, toxinas, fármacos, produtos endógenos, etc (STAUD, 2004). Foi comprovado por Hasegawa *et al.* que a HCTZ também age como substrato desta proteína, o que diminui sua concentração máxima disponível no lumen intestinal e consequente absorção (HASEGAWA, 2007). Com o efeito inibitório exercido pelo sal biliar sobre a BCRP, houve maior concentração de HCTZ disponível, o que ocasionou um efeito diurético prolongado nos animais que ingeriram o complexo H $\beta$ C. Considerando que a BCRP está presente também nos rins (HASEGAWA, 2007), é possível que a inibição renal desta proteína diminua a taxa de excreção da HCTZ, ocasionando um efeito mais duradouro.

Para a quantificação da natriurese exercida pelos complexos, foi utilizado o método de quantificação eletrolítica de íons sódio e cloro, bem estabelecido pela

literatura (OPIE e KAPLAN, 1991), e os resultados podem ser observados na figura 21B. Em 2, 4, 8 e 24hs os complexos de inclusão apresentaram excreção de  $\text{Na}^+$  significativa em comparação ao grupo controle. Na avaliação da kaliurese (figura 21C) e cloriurese (figura 21D) não foram encontradas diferenças significativas entre os perfis de excreção de todas as amostras analisadas.

Figura 21: Resultados obtidos nos ensaios in-vivo para os complexos H $\beta$ C

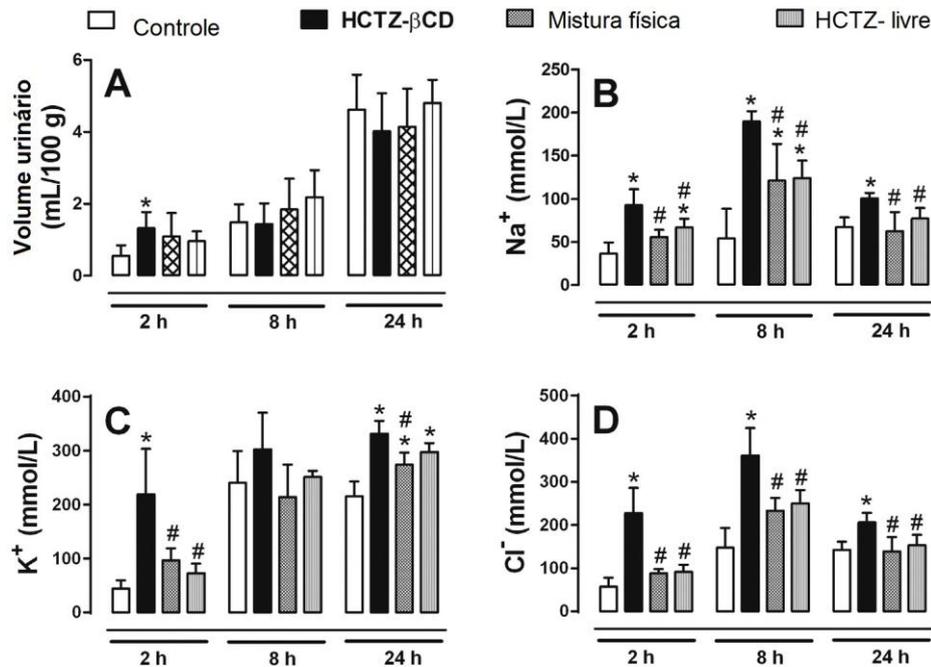


Onde: **A** – diurese; **B** – natriurese; **C** – kaliurese; **D** – cloriurese. A análise estatística foi realizada através de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo – controle; # $P < 0,05$  diferença significativa entre os complexos.

Em comparação, os resultados obtidos por Mendes (2016) para os complexos contendo apenas a  $\beta$ CD (figura 22) mostraram excreção urinária antecipada (figura 22A), sugerindo que a complexação alterou a velocidade de liberação do fármaco, porém não houve diferença significativa na diurese observada nos outros tempos. Já na excreção eletrolítica houve acentuada natriurese (figura 22B) e a mesma iniciou no mesmo tempo do fármaco livre (2 h), e foi mantida por 24 h. A kaliurese (22C) apresentou excreção significativa nos tempos de 2 e 24 h, enquanto a cloriurese

(22D) manteve-se por 24 h. Como mencionado anteriormente, este efeito pode ser proveniente da complexação e consequente amorfização da HCTZ, que é melhor absorvida que o fármaco em sua forma livre (MENDES, 2016).

Figura 22: Resultados obtidos nos ensaios in-vivo para os complexos H $\beta$



Onde: **A** – diurese; **B** – natriurese; **C** – kaliurese; **D** – cloriurese. A análise estatística foi realizada através de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. \*P < 0,05 quando comparado ao grupo – controle; #P < 0,05 diferença significativa entre os complexos.

Os resultados obtidos sugerem que a administração de uma única dose dos complexos de inclusão melhorou o perfil de diurese da HCTZ. Nos complexos H $\beta$  houve uma maior excreção, porém nos complexos H $\beta$ C observou-se efeito excretor prolongado. Houve aumento do volume urinário, acompanhada de significativa excreção eletrolítica, o que comprova a eficácia da complexação para a melhoria das propriedades de dissolução e solubilidade limitantes da HCTZ.

A formulação contendo complexo HCTZ: $\beta$ CD com adição de colato apresentou melhor efeito *in vivo*, demonstrando a possibilidade de aprimorar o perfil farmacológico de fármacos BCS IV com a utilização desta tecnologia.

## 5. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido em CLAE para a identificação da HCTZ e seus produtos de degradação se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto;
- Foi evidenciado que a complexação com  $\beta$ CD e colato de sódio conferem proteção fotolítica à HCTZ;
- Os ensaios de solubilidade de fases demonstraram que o colato de sódio na concentração de 2 mM obteve melhor resultado para a complexação;
- A caracterização físico-química revelou que houve a complexação da HCTZ com a  $\beta$ CD;
- Os ensaios de dissolução em fluido gástrico simulado revelaram que o complexo contendo o colato de sódio teve um pequeno atraso em sua liberação inicial, quando comparado ao complexo sem o mesmo. Contudo, o complexo contendo o colato teve um perfil de liberação superior a partir de 40 minutos do experimento, porém, foi constatado que não houve diferença estatística significativa entre os complexos;
- Os estudos de permeabilidade demonstraram que a complexação não interfere de forma significativa no coeficiente de permeabilidade da HCTZ. Porém, a adição de colato concedeu à formulação uma maior quantidade total de HCTZ permeada, sugerindo maior solubilização do fármaco no lumen intestinal e consequente aumento em sua absorção;
- Os complexos de inclusão com adição de colato revelaram melhor perfil *in-vivo* em comparação ao fármaco puro e sua mistura física, demonstrando a utilidade desta ferramenta para a melhoria das características dos fármacos BCS classe IV.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R.; SINHA, A. D. Thiazide diuretics in advanced chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 6, p. 299-308, 2012.

ALMEIDA, M. S.; GONÇALVES, P. A.; OLIVEIRA, E. I.; CARVALHO, H. C. Renal denervation for resistant hypertension. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v 34, p. 125-135, 2015.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, 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, n. 3, p. 413-20, 1995.

ANANDKUMAR, R. T.; GURUPADAYYA, B. M.; NEERAJ, S.; CHANDAN, R. S. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Hydrochlorothiazide, Ramipril and Telmisartan in Tablet Dosage Form. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 3, p. 1290-1293, 2012.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M.; BROWNELL, C. pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. **Pharmaceutical research**, v. 17, n. 1, p. 85-89, 2000.

BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKACS-NOVAK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 335-41, 2008.

BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 629-636, 2008.

BERNARDI, L.S.; OLIVEIRA, P.R.; MURAKAMI, F.S., SILVA, M.A.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, p. 729–733, 2009.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução (RE) Nº. 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução (RDC) Nº. 45, de 09 de agosto de 2012**. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2012.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Professional, 2010.

BUCKLEY, S. T.; FISCHER, S. M.; FRICKER, G.; BRANDL, M. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 235-250, 2012.

CAREY, R. M. The Intrarenal Renin-Angiotensin System in Hypertension. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 3, p. 204-210, 2015.

CHADHA, R.; BHANDARI, S.; KHULLAR, S.; MANDAL, S. K.; JAIN, D. V. S. Characterization and Evaluation of Multi-Component Crystals of Hydrochlorothiazide. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 9, p. 2479-2489, 2014.

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; BRAHMESHWAR, M.; SANJAY, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 1-15, 2009.

CHUN, I. K.; KYUNG, M. L.; KYUNG, L. E.; GWAK, H. S. Effects of Bile Salts on Gastrointestinal Absorption of Pravastatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2281-2287, 2012.

CIBOROWSKI, M.; ICARDO, M. C.; MATEO, J. V. C.; CALATAYUD, J. M. FI-chemiluminometric study of thiazides by on-line photochemical reaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 693-700, 2004.

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

DELRIVO, A.; ZOPPI, A.; LONGHI, M. R. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1980-1988, 2011.

DEVENTER, K.; BAELE, G.; VAN EENOO, P.; POZO, O.J.; DELBEKE, F.T. Stability of selected chlorinated thiazide diuretics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 519-524, 2009.

EL-GIZAWY, S. A.; OSMAN, M. A.; ARAFA, M. F.; EL MAGHRABY, G. M. Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 773-778, 2015.

FANG, X.; BIBART, R.T.; MAYR, S.; YIN, W.; HARMON, P.A.; MCCAFFERTY, J.F.; TYRRELL, R.J.; REED, R.A. Purification and identification of an impurity in bulk hydrochlorothiazide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 1800-1809, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5<sup>a</sup> ed. Parte I. São Paulo: ATHENEU, 2010.

FEILH, F.; WAEBER, B. Are all diuretics equal for the treatment of hypertensive patients? **Hipertensión y riesgo vascular**, v. 29, n. 4, p. 152-155, 2012.

FILIPOVSKI, J.; WIDIMSKÝ JR, J.; SPINAR, J. Summary of 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension Prepared by the Czech Society of Hypertension/ Czech Society of Cardiology. **Cor et Vasa**, v. 56, p. 494-518, 2014.

FREITAG, M.; GALOPPINI, E. Molecular host–guest complexes: Shielding of guests on semiconductor surfaces. **Energy & Environmental Science**, v. 4, p 2482-2494

FRISO, S.; CARVAJAL, C. A.; FARDELLA, C. E.; OLIVIERI, O. Epigenetics and arterial hypertension: the challenge of emerging evidence. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 154-165, 2015.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

HASEGAWA, M.; KUSUHARA, H.; ADACHI, M.; SCHUETZ, J. D.; TAKEUCHI, K.; SUGIYAMA, Y. Multidrug Resistance Associated Protein 4 Is Involved in the Urinary Excretion of Hydrochlorothiazide and Furosemide. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, p. 37-45, 2007.

HACIOGLU, F. ONAL, A. Determination of Eprosartan Mesylate and Hydrochlorothiazide in Tablets by Derivative Spectrophotometric and High-Performance Liquid Chromatographic Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 688-693, 2012.

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

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-solubility techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, n. 2, p. 117-212, 1965.

HOLM, R.; MULLERTZ, A.; MU, H. Bile salts and their importance for drug absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, n. 1, pag 44-55, 2013.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (November 2005) International Conference on Harmonization**. Geneva, Switzerland. GUIDELINE, I. H. T. 2005.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23/24, p. 1173-1184, 2005.

JAIN, D.; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11-35, 2013.

JINGHONG, L.; GAO, X.; PENG, L.; SUN, H.; DAI, G. Effects of hydrochlorothiazide on cardiac remodeling in a rat model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 314-321, 2011.

JOSHI, S. J.; KARBHARI, P. A.; BHOIR, S. I.; BINDU, K. S.; DAS, C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 362-371, 2010.

KALINKOVA, G. N. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v.187, p.1-15, 1999.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C, BERMEJO, N.; LENERMAS, H; HUSSAIN, A. S.; JUNQINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

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

KRATZ, Jadel Muller. **Implementação e aplicação do modelo *in vitro* com células CACO-2 para estudo da permeabilidade intestinal de fármacos**. 2011. 186 f. Tese de doutorado em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

LAI, Y. **Transporters in Drug Discovery and Development**. Oxford: Woodhead Publishing, p. 316-325, 2013

LI; ZHANG, Y.H.; WU, Y.N.; XIONG, X.L.; ZHANG, Y.H. Inclusion complex of trimethoprim with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3, p. 824-829, 2005.

LIANDONG, H.; ZHANG, H.; SONG, W.; GU, D.; HU, Q. Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1719-1724, 2012.

LIPINSKI, C. A. Poor Aqueous Solubility-an Industry Wide Problem in ADME Screening. **American Pharmaceutical Review**, v. 5, p. 82-85, 2002.

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S. B.; BREWSTER, M. E.; KONRÁÐSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 10, p. 2532-2546, 2007.

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

MALDONADO-VALDERRAMA, J.; WILDE, P.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A. The role of bile salts in digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 36-46, 2011.

MANSIA, G.; GRASSI, G.. The central sympathetic nervous system in hypertension. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 117, p. 329-335, 2013.

McDAID, F.M., BARKER, S.A.; FITZPATRICK, S.; PETTS, C.R., CRAIG, D.Q.M. Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug–excipient interactions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 252, p. 235–240, 2003.

MENDES, Cassiana. **Emprego de estratégias para a melhoria das propriedades biofarmacêuticas da hidroclorotiazida e norfloxacino: formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas**. 2013. 180 f. Dissertação de Mestrado em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

MENDES, C.; BUTTCHEVITZ, A.; KRUGER, J. H; KRATS, J. M.; SIMÕES, C. M. O.; BENEDET, P. O.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, M. A. S. Inclusion Complexes of Hydrochlorothiazide and  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical characteristics, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 71-78, 2016.

MESSERLI, L.H.; MAKANI, H.; BENJO, A.; ROMERO, J.; ALVIAR, C.; BANGALORE, S. Antihypertensive efficacy of hydrochlorothiazide as evaluated by ambulatory blood pressure monitoring. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, p. 590-600, 2011.

MIRANDA, J. C. D.; MARTINS, T. E. A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H. G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665-681, 2011.

MOLLICA, J.A.; REHM, C.R.; SMITH, J.B. Hydrolysis of hydrochlorothiazide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 635-636, 1969.

MOLLICA, J.A.; REHM, C.R.; SMITH, J.B.; GOYAN, H.K. Hydrolysis of benzothiadiazines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 1380-1384, 1971.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238-250, 2014.

NASKAR, B.; MONDAL, S.; MOULIK, S. P. Amphiphilic activities of anionic sodium cholate (NaC), zwitterionic 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and their mixtures: A comparative study. **Colloids and Surfaces**, v. 112, p. 155-164, 2013.

OLESEN, N. E.; WESTH, P.; HOLM, R. Determination of thermodynamic potentials and the aggregation number for micelles with the mass-action model by isothermal titration calorimetry: A case study on bile salts. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 453, p. 79-89, 2015.

OLIVEIRA, P. R.; BERNARDI, L. S.; MURAKAMI, F. S.; MENDES, C.; SILVA, M. A. S. Thermal characterization and compatibility studies of norfloxacin for development of extended release tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 741-745, 2009.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; TOWARD, M. A.; CAMPOS, R. R.; PATON, J. F. R. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 183, p. 23-29, 2014.

OPIE, L. H.; KAPLAN, N. M.; THADANI, U.  $\beta$ -blocking agents. **Drugs for the heart**, Philadelphia; WB Saunders, 1991, p. 1-25, 1991.

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

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.386-389, 2012.

RASHEED, A.; KUMAR, A.; SRAVANTHI, V. Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567-598, 2008.

REDDY, V.; SRIDHAR, A.; MACHADO, R. F.; CHEN, J. High sodium causes hypertension: evidence from clinical trials and animal experiments. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2015.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; LLEWELLYN, P. Chapter 2.12 – Thermal Analysis. **Developments in Clay Science**, v. 5, p. 361-379, 2013.

ROUSH, G. C.; KAUR, R.; ERNST, M.E.. Diuretics: A Review and Update. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p 5-13, 2014.

SANGOI, M. S.; WRASSE-SANGOI, M.; OLIVEIRA, P. R.; ROLIM, C. M.; STEPPE, M. Simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorothiazide from their pharmaceutical preparations using a validated stability-indicating MEKC method. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 15, p. 1859-1866, 2011.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. **Revista da SOCERJ**, v. 15, n. 4, p. 210-218, 2002.

SANPHUI, P.; RAJPUT, L.. Tuning solubility and stability of hydrochlorothiazide co-crystals. **Acta Crystallographica**, v. 70, p 81-90, 2014.

SANTOVEÑA, A.; HERNÁNDEZ-PAIZ, Z.; FARIÑA, J.B.. Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p 360-364, 2012.

SEAN, C.; SWEETMAN, M. The complete drug reference. London: Pharmaceutical Press, 2002.

SHAIKH, H. S.; THUSLEEM, O. A.; MUNEERA, M. S.; AKMAL, J.; KONDAGULI, A. V.; RUCKMANI, K. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1055-1057, 2008.

SILVA, F.; FIGUEIRAS, A.; GALLARDO, E.; NERÍN, C.; DOMINGUES, F.C.. Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. **Food Chemistry**, v. 145, p 115-125, 2014.

STAUD, F.; PAVEK, P. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v 37, p. 720-725, 2005

TAGLIARI, M.P.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S. KUMINEK, G.; VALENTE, B.; OLIVEIRA, P.R.; SILVA, M.A.S. Development and validation of a stability-indicating LC method to quantify hydrochlorothiazide in oral suspension for pediatric use. **Chromatographia**, v. 67, p. 647-652, 2008.

TANG, P.; LI, S.; WANG, L.; YANG, H.; YAN, J.; LI, H. Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297-305, 2015.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization-part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2012.

TAKAHASHI, A. I.; VEIGA, F. J. B.; FERRAZ, H. G. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization-part II: x-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 2012.

Van THIEL, B. S.; Van Der PLUJIM, I.; RIET, L.; ESSERS, J.; DANSER, A. H. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 763 (A), pag. 3-14, 2015.

UEDA, S.; YAMAOKA, K.; YUI, J.; SHIGEMATSU, A.; NAKAGAWA, T. Evaluation of capacity-limited first-pass effect through liver by three-points sampling in portal and hepatic veins and systemic artery. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p. 852-857, 2002.

United States Pharmacopeia. USP 30. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD, USA: 2011.

VEIGA, F.; TEIXEIRA-DIAS, J.; KEDZIEREWICZ, F.; SOUSA, A.; MAINCENT, P. Inclusion complexation of tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1996.

VEIGA, F.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, L. S. S. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva, 2006.

YUAN, C.; ZHIFANG, L.; ZENGYU, J. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, 152, p. 140-145, 2014.

ZHANG, W.; LI, X.; YU, T.; YUAN, L.; RAO, G.; LI, D.; MU, C. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of *trans*-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 74, p. 55-62, 2015.