



Avaliação da estabilidade físico-química do fármaco hipotensor diazóxido

JOANA FILIPA SOARES PEREIRA

Outubro de 2022

Outubro de 2022

Avaliação da estabilidade físico-química do fármaco hipotensor diazóxido

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química, área de especialização Qualidade

AUTORA

Joana Filipa Soares Pereira

ORIENTAÇÃO

Eng.º Jorge Garrido – ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto

Mestrado em Engenharia Química - Qualidade

Dissertação / Estágio

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação reúne contributos de várias pessoas, que me ajudaram a alcançar os meus objetivos, por isso deixo-lhes aqui algumas palavras com um profundo sentimento de agradecimento.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e ao Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI), pela oportunidade e privilégio que tive em estagiar num grupo de investigação e de desenvolvimento multidisciplinar de tão elevada qualidade e reconhecimento.

Ao meu orientador, Eng.º Jorge Garrido, pela confiança e exigência desafiadora que depositou em mim e no meu trabalho, bem como pela sua afabilidade, boa disposição, orientação, disponibilidade e por todo o seu saber que foi essencial para o enriquecimento deste trabalho.

A todos elementos do CIETI, com quem tive oportunidade de estabelecer contacto, pelo acolhimento extraordinário, todo o apoio, acompanhamento e partilha de conhecimentos.

Aos docentes que ministraram as unidades curriculares do Mestrado em Engenharia Química - Qualidade, pela sua participação, colaboração e partilha de conhecimentos, fundamentais à realização deste projeto.

Aos meus colegas e amigos, pelo companheirismo, amizade e pelos momentos de felicidade partilhados e, acima de tudo, por estarem constantemente ao meu lado.

À minha família, pela confiança, incentivo, preocupação, apoio incondicional e por todos os ensinamentos de vida que cada um me foi transmitindo com muito amor e carinho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização dos meus objetivos.

Resumo

A elaboração desta dissertação teve como finalidade descrever o trabalho realizado no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio do 2.º ano do Mestrado em Engenharia Química - Qualidade, do ISEP. O estágio realizado no CIETI teve como principal objetivo a avaliação da estabilidade físico-química de produtos farmacêuticos, tendo em vista a definição do prazo de utilização de medicamentos manipulados disponibilizados em ambulatório, mais precisamente do fármaco hipotensor diazóxido.

Numa fase inicial foi necessário avaliar a solubilidade do diazóxido em vários solventes, nomeadamente em DMSO, acetonitrilo e metanol, uma vez que esta substância apresenta uma baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos. A avaliação da estabilidade físico-química do diazóxido foi efetuada através de ensaios de estabilidade térmica, a diferentes temperaturas, e de fotorreatividade. Nos ensaios de estabilidade térmica, amostras líquidas e sólidas foram colocadas à temperatura de 1,6°C, temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e 37°C durante 30 dias. Em intervalos de tempo predeterminados, avaliou-se a concentração de diazóxido presente nas amostras usando um método cromatográfico (HPLC). Os ensaios de fotorreatividade envolveram o estudo da absorvidade molar e ensaios de deteção de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS). Paralelamente, foi estudada a possibilidade de usar a encapsulação em ciclodextrinas como forma de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do diazóxido. Prepararam-se complexos de inclusão com duas ciclodextrinas, HP- γ -CD e HP- β -CD, e determinaram-se as suas constantes de estabilidade.

Os estudos realizados permitiram verificar que o diazóxido é termicamente estável, nas condições testadas, durante pelo menos 30 dias. Quanto à fotorreatividade foi possível inferir que o diazóxido é fotorreativo. Os dados preliminares sugeriram que o diazóxido forma complexos de inclusão 1:1 com ambas as ciclodextrinas testadas e constantes de estabilidade de $71,8 \pm 8,1 \text{ M}^{-1}$ e $97,3 \pm 10,8 \text{ M}^{-1}$ para a HP- γ -CD e HP- β -CD, respetivamente. A caracterização por DSC do complexo sólido diazóxido/HP- β -CD, preparado por *kneading*, comprovou a formação do complexo de inclusão.

Palavras-Chave: Medicamentos manipulados, Diazóxido, Estabilidade térmica, Fotorreatividade, Ciclodextrinas

Abstract

The elaboration of this dissertation aimed to describe the work carried out within the curricular unit of Dissertation/Internship of the 2nd year of the Master's degree in Chemical Engineering - Quality, at ISEP. The internship held at CIETI had as its main objective the evaluation of the physicochemical stability of pharmaceutical products, with a view to defining the period of use of compounded medications made available in an outpatient environment, more precisely the hypotensive drug diazoxide.

In an initial phase, it was necessary to evaluate the solubility of diazoxide in several solvents, namely in DMSO, acetonitrile and methanol, since this substance has low solubility in water and in most organic solvents. The evaluation of the physicochemical stability of diazoxide was carried out by performing tests of thermal stability, at different temperatures, and of photoreactivity. In the thermal stability tests, liquid and solid samples were placed at a temperature of 1.6°C, room temperature ($\approx 19^\circ\text{C}$) and 37°C for 30 days. At predetermined time intervals, the concentration of diazoxide present in the samples was evaluated using a chromatographic method (HPLC). The photoreactivity assays involved the study of molar absorptivity and Reactive Oxygen Species (ROS) detection assays. At the same time, the possibility of using encapsulation in cyclodextrins was studied to improve the solubility, stability and bioavailability of diazoxide. Inclusion complexes were prepared with two cyclodextrins, HP- γ -CD and HP- β -CD, and their stability constants were determined.

The studies carried out made it possible to verify that diazoxide is thermally stable, under the conditions tested, for at least 30 days. Regarding photoreactivity, it was possible to infer that diazoxide is photoreactive. Preliminary data suggested that the diazoxide forms 1:1 inclusion complexes with both cyclodextrins tested and stability constants of $71.8 \pm 8.1 \text{ M}^{-1}$ and $97.3 \pm 10.8 \text{ M}^{-1}$ for HP- γ -CD and HP- β -CD, respectively. The DSC characterization of the solid diazoxide/HP- β -CD complex, prepared by *kneading*, confirmed the formation of the inclusion complex.

Keywords: Compounded medications, Diazoxide, Thermal stability, Photoreactivity, Cyclodextrins

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xv
Lista de Siglas.....	xvii
Lista de Símbolos	xix
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Apresentação do CIETI	1
1.3. Organização da Tese	2
2. Contexto e Fundamentos Teóricos	3
2.1. Medicamentos	3
2.1.1. Evolução Histórica	5
2.1.2. Contexto Atual.....	6
2.2. Medicamentos Manipulados	8
2.2.1. Preparação no âmbito Hospitalar.....	9
2.2.2. Razões e vantagens do seu uso	11
2.2.3. Estabilidade	14
2.2.4. Prazo de Utilização	23
2.2.5. Controlo de Qualidade.....	26
2.2.6. Enquadramento Legal.....	27
2.3. Diazóxido.....	29

2.3.1.	Características.....	29
2.3.2.	Formulações disponíveis no mercado.....	30
3.	Metodologia experimental.....	33
3.1.	Reagentes e Solventes.....	33
3.2.	Equipamento e Material.....	34
3.3.	Escolha do solvente	35
3.4.	Determinação da curva de calibração por espectrofotometria de UV-Vis	35
3.5.	Estabilidade físico-química do diazóxido.....	36
3.5.1.	Estabilidade térmica	36
3.5.2.	Fotorreatividade.....	38
3.6.	Complexos de inclusão com CDs	40
3.6.1.	Estudos de solubilidade em água desionizada.....	40
3.6.2.	Preparação dos complexos de inclusão	42
3.6.3.	Caracterização do complexo diazóxido/HP- β -CD por DSC	42
4.	Resultados e Discussão.....	45
4.1.	Escolha do solvente	45
4.2.	Determinação da curva de calibração por espectrofotometria de UV-Vis	46
4.3.	Estabilidade físico-química do diazóxido.....	48
4.3.1.	Estabilidade térmica	48
4.3.2.	Fotorreatividade.....	61
4.4.	Complexos de inclusão com CDs	66
4.4.1.	Estudos de solubilidade em água desionizada.....	66
4.4.2.	Preparação e caracterização do complexo diazóxido/HP- β -CD.....	72
5.	Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro.....	75
	Bibliografia.....	77

Índice de Figuras

Figura 2-1: Influência da temperatura sobre a velocidade de degradação (adaptado de [9]).	17
Figura 2-2: Passagem do oxigénio tripleto a oxigénio singleto pela ação da luz (adaptado de [9]).	19
Figura 2-3: Diferentes espécies de oxigénio (adaptado de [9]).	19
Figura 2-4: Reação de hidrólise do ácido acetilsalicílico em ácido salicílico (adaptado de [10]).	22
Figura 2-5: Fórmula estrutural do diazóxido em 3D (adaptado de [17]).	29
Figura 2-6: Fórmula estrutural do diazóxido em 2D (adaptado de [17]).	30
Figura 3-1: Amostras líquidas (esquerda) e sólidas (direita) usadas para o estudo da estabilidade térmica.	38
Figura 3-2: Critérios para um produto químico seja considerado fotorreativo (adaptado de [29]).	40
Figura 4-1: Espectro de UV-Vis da solução de diazóxido 0,1 mM preparada em DMSO.	45
Figura 4-2: Espectros de UV-Vis das soluções de diazóxido (—) 10 µM, (—) 20 µM, (—) 40 µM, (—) 60 µM, (—) 80 µM e (—) 100 µM preparadas numa mistura DMSO:água (1:9).	47
Figura 4-3: Curva de calibração obtida entre a absorvância a 266 nm e a concentração de diazóxido (mmol/L).	48
Figura 4-4: Cromatogramas obtidos para as diferentes concentrações de diazóxido (—) 17 mg/L, (—) 25 mg/L, (—) 50 mg/L, (—) 75 mg/L e (—) 100 mg/L em acetonitrilo.	49
Figura 4-5: Curva de calibração obtida entre a área dos picos (u.a.) e a concentração de diazóxido (mg/L).	50
Figura 4-6: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a (—) 0 e (—) 30 dias.	51
Figura 4-7: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C.	52
Figura 4-8: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente (≈19°C), a (—) 0 e (—) 30 dias.	53

Figura 4-9: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$).....	54
Figura 4-10: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C , a (—) 0 e (—) 9 dias.....	55
Figura 4-11: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no frigorífico $1,6^{\circ}\text{C}$, a (—) 1 e (—) 30 dias.....	56
Figura 4-12: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada no frigorífico a $1,6^{\circ}\text{C}$	57
Figura 4-13: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$), a (—) 1 e (—) 30 dias.	58
Figura 4-14: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$).	59
Figura 4-15: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C , a (—) 1 e (—) 30 dias.....	60
Figura 4-16: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C	61
Figura 4-17: Espectro de absorção UV-Vis da solução de diazóxido $10\ \mu\text{g/mL}$ preparada em DMSO.....	62
Figura 4-18: Solução de SO antes e após a sua exposição à radiação.....	65
Figura 4-19: Solução de SA antes e após a sua exposição à radiação.....	65
Figura 4-20: Espectros de UV-Vis das soluções de diazóxido em (—) 0 mM, (—) 5 mM, (—) 10 mM, (—) 20 mM e (—) 30 mM de HP- γ -CD preparadas em água desionizada.	67
Figura 4-21: Diagrama de solubilidade do diazóxido em água desionizada na presença de HP- γ -CD.....	70
Figura 4-22: Diagrama de solubilidade do diazóxido em água desionizada na presença de HP- β -CD.....	70
Figura 4-23: Curvas DSC obtidas para o (—) diazóxido, para a (—) HP- β -CD e para o (—) respetivo complexo de inclusão formado pelo método de kneading.	72

Índice de Tabelas

Tabela 2-1: Lista de medicamentos identificados pelo Infarmed relativos a pedidos de AUE de benefício clínico reconhecido (adaptado de [25]).	32
Tabela 3-1: Preparação das soluções de diazóxido e CD usadas no estudo de solubilidade em água desionizada.	41
Tabela 4-1: Absorvâncias obtidas ao comprimento de onda máximo, dos espectros das soluções de diazóxido preparadas em diferentes proporções de solvente DMSO:água. 46	
Tabela 4-2: Absorvâncias obtidas para as diferentes soluções-padrão de diazóxido (média obtida para 3 réplicas).....	47
Tabela 4-3: Áreas dos picos obtidos para as diferentes concentrações de diazóxido (média obtida para 3 réplicas).....	49
Tabela 4-4: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).	51
Tabela 4-5: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente (≈19°C), a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).....	53
Tabela 4-6: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C, a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).	55
Tabela 4-7: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).	57
Tabela 4-8: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente (≈19°C), a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).	59
Tabela 4-9: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C, a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).	60
Tabela 4-10: Absortividade molar e comprimento de onda máximo da solução diazóxido de 10 µg/mL.....	63

Tabela 4-11: Valores de referência de SO e SA para o controlo positivo do quinino [29].	64
Tabela 4-12: Valores de SO e SA obtidos para o diazóxido no ensaio da fotorreatividade.	65
Tabela 4-13: Absorvâncias e concentrações de diazóxido obtidas para as diferentes concentrações de HP- γ -CD em água desionizada à temperatura de 20°C, após 48 horas.	68
Tabela 4-14: Absorvâncias e concentrações de diazóxido obtidas para as diferentes concentrações de HP- β -CD em água desionizada à temperatura de 20°C, após 48 horas.	69
Tabela 4-15: Comparação dos dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade do diazóxido em HP- β -CD e HP- γ -CD.	71

Lista de Abreviaturas

CD – Ciclodextrina

CHI – Hiperinsulinemia congénita

DL – Decreto-Lei

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HP- β -CD – 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina

HP- γ -CD – 2-Hidroxiopropil- γ -ciclodextrina

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

NaH₂PO₄.12H₂O – Di-hidrogenofosfato de sódio dodecahidratado

NaH₂PO₄.H₂O – Di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado

NBT – Azul de nitro-tetrazólio

NBT⁺ – Monoformazan

nm – Nanómetros

O₂⁻ – Anião superóxido

O₂ – Oxigénio

OH⁻ – Radical livre hidroxilo

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNO – *p*-nitrosodimetilanilina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

rpm – Rotações por minuto

SA – Anião superóxido

SO – Oxigénio singlete

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

Lista de Siglas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

AUE – Autorização de Utilização Excepcional

CIETI – Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial

FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia

FDA – Federal Drug Administration

FNM – Formulário Nacional de Medicamentos

INFARMED – Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto

LABORIS – Núcleo de Investigação em Sistemas de Teste

NBIN – Núcleo de Biomateriais e Nanotecnologia

NEPA – Núcleo de Energia, Processos e Ambiente

Lista de Símbolos

$A_{440 (-)}$ - Absorvância a 440 nm antes da exposição à radiação

$A_{440 (+)}$ - Absorvância a 440 nm após exposição à radiação

$A_{560 (-)}$ - Absorvância a 560 nm antes da exposição à radiação

$A_{560 (+)}$ - Absorvância a 560 nm após exposição à radiação

® – Marca registada

a – Branco antes da exposição à radiação

A – Fator de frequência

Abs – Absorvância

b – Branco após exposição à radiação

c – Concentração

Ea – Energia de ativação

K – Constante de estabilidade do complexo

k – Constante de velocidade de reação

m – Declive

R – Constante dos gases perfeitos

T – Temperatura absoluta

y_0 – Ordenada na origem

β – Beta

γ – Gama

l – Percurso ótico

ε – Absortividade molar

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Esta dissertação traduz o trabalho desenvolvido no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio do 2.º ano do Mestrado em Engenharia Química - Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

As atividades experimentais foram realizadas nos laboratórios do Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) do ISEP e tiveram como principal objetivo a avaliação da estabilidade físico-química de produtos farmacêuticos, tendo em vista a definição do prazo de utilização de medicamentos manipulados disponibilizados em ambulatório. O trabalho desenvolvido envolveu a avaliação da estabilidade físico-química do fármaco hipotensor diazóxido, presente em produtos farmacêuticos hospitalares.

1.2. Apresentação do CIETI

O CIETI é um grupo de investigação e de desenvolvimento multidisciplinar reconhecido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), sediado no ISEP, a Escola de Engenharia do Politécnico do Porto, que tem como objetivo promover a investigação para a criação e desenvolvimento de novos produtos, processos e sistemas que contribuam para a inovação na indústria. Este centro dá, igualmente, suporte à educação científica no ISEP integrando alunos de licenciatura, mestrado e coorientando teses de doutoramento.

O centro encontra-se estruturado em três núcleos de investigação aplicada: Núcleo de Energia, Processos e Ambiente (NEPA), Núcleo de Biomateriais e Nanotecnologia (NBIN) e Núcleo de Investigação em Sistemas de Teste (LABORIS), com um conjunto de parcerias nacionais e internacionais relevantes. As atividades do grupo dividem-se em quatro linhas de trabalho: biomateriais e nanotecnologias; energia e ambiente; engenharia e processo; laboratórios remotos e sistemas de teste e depuração.

1.3. Organização da Tese

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos; introdução, contexto e fundamentos teóricos, metodologia experimental, resultados e discussão e conclusões e sugestões para trabalho futuro.

No primeiro capítulo é realizada uma breve introdução ao tema do trabalho e à instituição de investigação onde foi desenvolvido o projeto.

No capítulo dois são apresentados os fundamentos teóricos associados ao trabalho, onde são descritas a evolução histórica e o contexto atual dos medicamentos, conceitos relativos à preparação, vantagens, estabilidade, prazos de utilização, controlo de qualidade e enquadramento legal de medicamentos manipulados, e por fim, informações sobre a substância ativa estudada, o diazóxido.

No terceiro capítulo são enumeradas as várias metodologias experimentais utilizadas ao longo deste projeto.

No capítulo quatro, são apresentados os resultados experimentais obtidos e correspondente discussão.

Por fim, no capítulo cinco são apresentadas todas as conclusões, assim como, as sugestões para trabalho futuro.

2. Contexto e Fundamentos Teóricos

Nesta secção, são apresentados os fundamentos teóricos associados ao trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação.

2.1. Medicamentos

Em todas as sociedades e culturas, os medicamentos são considerados uma parte fundamental e crítica dos serviços de saúde. Quando estes se encontram disponíveis, são utilizados na prevenção e no tratamento de diversas patologias, contribuindo definitivamente para o aumento da esperança de vida, assim como para a melhoria da qualidade de vida da população [1].

O Decreto-Lei (DL) nº 176/2006 de 30 de agosto estabeleceu o regime jurídico dos medicamentos de uso humano e marcou uma profunda mudança no setor, designadamente nas áreas do fabrico, controlo de qualidade, segurança e eficácia e comercialização dos medicamentos. Para efeitos do disposto no DL entende-se por [2]:

- **Medicamento:** toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas;
- **Substância ativa:** Qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a ser utilizada no fabrico de um medicamento e que, quando utilizada no seu fabrico, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica com vista a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico;
- **Excipiente:** Qualquer componente de um medicamento, que não a substância ativa e o material da embalagem, adicionado como adjuvante na formulação;

- **Forma farmacêutica:** Estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidos às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado;
- **Dosagem:** teor de substância ativa, expresso em quantidade por unidade de administração ou por unidade de volume ou de peso, segundo a sua apresentação.

Os medicamentos podem classificar-se em dois grandes grupos [1, 3]:

- **Especializados ou especialidades:** preparações farmacêuticas apresentadas no mercado em embalagem própria, destinadas a ser entregues ao consumidor e com uma designação ou marca privativa, obtidos industrialmente;
- **Manipulados:** medicamentos preparados de forma individualizada e artesanal, dirigida a grupos populacionais com características especiais, para os quais os medicamentos industrializados não dão uma resposta adequada, mostrando ser imprescindíveis nestas situações.

Os medicamentos são comercializados com uma determinada forma farmacêutica, a qual é obtida através de um longo processo de investigação e de um rigoroso processo de produção [4].

Os medicamentos têm uma longa história e as formas farmacêuticas têm-se alterado ao longo do tempo, algumas delas já se extinguíram ou sofreram modificação, outras são mais recentes ou absolutamente contemporâneas [4].

Atualmente, as formas farmacêuticas mais comuns são [3]:

- **Pós:** resultam da divisão dos fármacos animais, vegetais, minerais ou obtidos por síntese química, podendo constituir uma forma de administração direta ou destinarem-se à obtenção de outras formas galénicas;
- **Comprimidos:** são preparações farmacêuticas de consistência sólida, forma variada, geralmente cilíndrica ou lenticular, obtidos agregando, por meio de pressão, várias substâncias medicamentosas secas e podendo ou não se encontrar envolvidos por revestimentos especiais, tomando nesse caso, a designação de drageias;
- **Pastilhas:** são preparações farmacêuticas de consistência sólida, destinadas a se dissolverem lentamente na boca, preparadas por moldagem de uma massa

plástica constituída, na maioria das vezes, por mucilagens e/ou açúcar associados a princípios medicamentosos;

- **Cápsulas:** são preparações farmacêuticas constituídas por um invólucro de natureza, forma e dimensões variadas, contendo substâncias medicinais sólidas, pastosas ou líquidas;
- **Emulsões:** são produtos de aspeto leitoso resultantes da dispersão de um líquido num outro, com o qual não seja miscível, à custa de um agente emulsivo, cujo papel é o de facilitar a formação e tornar estável o sistema disperso assim obtido;
- **Suspensões:** são sistemas heterogéneos em que a fase externa ou contínua é líquida ou semissólida e a fase interna ou dispersa é constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado.

2.1.1. Evolução Histórica

O termo Farmácia Galénica representa uma homenagem ao médico-farmacêutico, Claudius Galenus, que viveu em Roma durante o segundo século desta era e escreveu várias obras nos diversos ramos da medicina e da farmácia, nomeadamente formulações de medicamentos e a forma de os preparar [3].

A designação de Farmácia Galénica foi introduzida no século XVI e foi criada para significar a “Farmácia dos medicamentos complexos” que se pretendeu opor à Farmácia Química ou ao ramo farmacêutico que se ocupava da preparação dos medicamentos contendo substâncias quimicamente definidas. Por medicamento complexo entendia-se o que resultava da transformação dos produtos naturais, denominados de drogas, em preparações farmacêuticas constituídas por misturas de componentes suscetíveis de serem administrados a enfermos. Se o produto natural, submetido à mencionada transformação, originava uma substância quimicamente definida, o medicamento com ela obtido designava-se de medicamento químico [3].

Durante muitos anos as substâncias medicamentosas de que o Homem dispunha eram exclusivamente constituídas por produtos de natureza animal, vegetal ou mineral. Posteriormente, com o isolamento dos princípios ativos, a humanidade teve a tentação de os substituir à droga. Este critério nem sempre foi acertado, dado que cada droga pode

conter mais do que um destes princípios, muitas vezes uns reforçando ou compensando a ação farmacológica apresentada pelos outros [3].

A tendência cada vez mais acentuada, da Farmácia Galénica, era a substituição quase sistemática das antigas fórmulas, executadas a partir da droga, pelos seus componentes principais isolados ou obtidos por síntese. Esta tendência foi justificada por razões de ordem económica, pela facilidade de preparação, pela necessidade da preparação de medicamentos estáveis durante o maior período possível e mais facilmente administráveis [5].

Nestas circunstâncias, observa-se que as Farmacopeias e Formulários modernos vão banindo inexoravelmente das suas monografias as fórmulas obtidas a partir dos produtos naturais. Códigos recentes, como o norte-americano, o britânico, as Farmacopeias Europeia e Portuguesa V e tantos outros, conservam uma percentagem mínima de extratos, tinturas, macerados, etc., incluindo, em contrapartida, um número cada vez maior de novos produtos de síntese ou isolados de vegetais, que empregam sob a forma de comprimidos, de supositórios, de injetáveis, etc [3].

2.1.2. Contexto Atual

Durante séculos a Farmácia Galénica baseou-se apenas no conhecimento empírico e a sua missão de transformar os produtos medicinais em medicamentos era apenas uma verdadeira arte. Atualmente, a Farmácia Galénica é considerada como uma ciência complexa e multifacetada, orientada em bases completamente novas, em que a preparação e disponibilização do medicamento nunca pode ser apreciada independentemente do fim que dele se pretende. Efetivamente, a disponibilização de medicamentos pressupõe o conhecimento pleno das propriedades físicas, químicas e biológicas dos produtos utilizados nas preparações, bem como os fins a que se destinam, exigindo que o farmacêutico possua um saber científico consistente [1].

Assim, compete à Farmácia Galénica a transformação de todas as substâncias medicamentosas em medicamentos, quer estas sejam de natureza complexa, quer constituídas por produtos químicos naturais ou sintéticos perfeitamente definidos [3].

As tendências mais recentes da Farmácia Galénica ao serviço da preparação de medicamentos concebidos e estudados com o fim de se obter maior eficácia terapêutica e segurança de manipulação levaram ao surgimento de dois ramos desta ciência [3]:

- **A Biofarmácia, Biofarmacotecnia ou Biogalénica:** tem como finalidade determinar as relações entre as propriedades físico-químicas dos fármacos, a sua forma de administração e os efeitos biológicos observados, constituindo uma ciência de extraordinário interesse, pois o mesmo fármaco pode ter uma ação mais ou menos potente e eficaz consoante as propriedades físico-químicas que exhibe e o modo como foi transformado em medicamento;
- **A Farmácia Clínica:** cuja importância se deve salientar pois o aparecimento de novos fármacos, cada vez mais potentes, obriga a cuidados particulares no que respeita às incompatibilidades físicas, químicas ou biológicas a que pode dar origem. Problemas complexos do foro toxicológico e de estabilidade medicamentosa são hoje correntes, devido em grande parte à administração simultânea de diversos medicamentos ao mesmo doente.

Após a década de sessenta do século passado assistiu-se ao nascimento e desenvolvimento de novos ramos da ciência farmacêutica, o que obrigou os profissionais da área a uma preparação curricular mais lata e mais profunda [3].

Há ainda muito caminho a percorrer neste sentido, tornando-se necessário atingir um equilíbrio judicioso entre as formulações tradicionais e a avalanche de novos dados e teorias que menosprezam a experiência das gerações passadas. É exemplo disto o aparecimento de formulações galénicas não tradicionais, tais como as preparações farmacêuticas de ação modificada e os novos sistemas terapêuticos [3].

A indústria farmacêutica não consegue ir ao encontro de todas as necessidades terapêuticas, uma vez que os medicamentos industrializados estão necessariamente limitados a um certo número de dosagens e de formas farmacêuticas, pelo que é relativamente frequente a não-existência no mercado do medicamento apropriado às necessidades específicas de um determinado doente. Existem diversas razões para tal facto, muitas delas farmacoeconómicas, mas por vezes devido também à dificuldade nos processos de formulação e fabrico e em obter determinadas matérias-primas usadas em certos produtos comerciais [4, 5].

2.2. Medicamentos Manipulados

Os medicamentos manipulados são medicamentos de preparação individualizada, que se justificam por constituírem a resposta terapêutica ajustada às exigências de um doente em particular, que apresenta um perfil fisiopatológico singular. Esta solução permite ajustar doses, preparar formulações mais adequadas, remover excipientes não toleráveis, alterar as características organoléticas, associar substâncias ativas indisponíveis no mercado, adequar as formas galénicas às vias de administração disponíveis, entre outros [4, 5].

Os medicamentos manipulados permitem obter associações de fármacos não comercializados, em casos em que a estratégia terapêutica assim o exige, tornando-se uma vantagem não só económica, mas também de eficácia terapêutica [6].

Sendo assim, a personalização da terapêutica em situações especiais constitui a principal razão para a preparação de medicamentos manipulados, que tem aumentado nos últimos anos, apresentando inúmeras vantagens, como alternativas terapêuticas válidas. Os medicamentos manipulados podem ser preparados pelas Farmácias Comunitárias ou pelos Serviços Farmacêuticos Hospitalares [6].

A massificação da produção de determinadas especialidades farmacêuticas, a falta de apoio e de incentivo por parte das entidades governamentais, e a inadequação dos medicamentos manipulados às exigências terapêuticas atuais, com formulações desenvolvidas e testadas que possam assegurar as necessidades clínicas do presente, são algumas razões pelas quais o mercado dos medicamentos manipulados em Portugal tem vindo a sofrer um decréscimo [6].

Os atuais padrões de qualidade na utilização de medicamentos manipulados são enquadrados num sistema de boas práticas a observar na preparação destes, de acordo com normas e requisitos aprovados pelo Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) [6].

No caso particular de Portugal, faz parte da legislação farmacêutica, a Portaria nº 594/2004, de 2 de junho, onde são descritas as “Boas Práticas de Medicamentos Manipulados” e, tal como a Farmacopeia Portuguesa, também estas devem servir de

orientação para os farmacêuticos que se dedicam à arte da manipulação de medicamentos [6].

A ciência que tem como objetivo preparar, conservar, acondicionar e dispensar preparações farmacêuticas é a Tecnologia Farmacêutica. Atualmente, esta ciência faz a transformação, quer dos produtos naturais, tais como animais, vegetais e minerais, quer de síntese ou os obtidos por processos biotecnológicos, em medicamentos. Compete à Tecnologia Farmacêutica, estudar a forma farmacêutica mais adequada, as compatibilidades entre as substâncias medicamentosas e o melhor meio de conservar os medicamentos, de modo a aumentar a biodisponibilidade e o período de utilização das preparações farmacêuticas [5].

De acordo com o DL n.º 90/2004 de 20 de abril e o DL n.º 95/2004 de 22 de abril entende-se como [5]:

- **Medicamento manipulado:** qualquer fórmula magistral ou preparado oficial, preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico;
- **Fórmula magistral:** todo o medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares, segundo uma receita médica destinado a um determinado doente;
- **Preparado oficial:** todo o medicamento preparado segundo as indicações compendiais de uma farmacopeia ou de um formulário, nos locais referidos no ponto anterior, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço.

2.2.1. Preparação no âmbito Hospitalar

Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares são um departamento com autonomia técnica e científica, que constitui uma estrutura essencial aos cuidados de saúde dispensados no meio hospitalar, com os objetivos de [5]:

- assegurar a terapêutica medicamentosa aos doentes, com qualidade, eficácia e segurança;
- integrar as equipas de cuidados de saúde;
- promover ações de investigação científica e de ensino.

Apesar das profundas mudanças verificadas nos últimos anos neste âmbito e no modo de elaboração das formas farmacêuticas, a secção de farmacotecnia continua a constituir uma parte fundamental dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares, permitindo alcançar importantes objetivos, tais como [5]:

- contribuir, com as demais áreas dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares para que este cumpra a sua missão no serviço clínico e colabore diretamente na assistência ao paciente hospitalizado e/ou ambulatorial;
- proporcionar, em qualquer momento, independentemente da disponibilidade do mercado, medicamentos adequados às necessidades específicas do hospital, ou de determinados doentes;
- garantir a eficiência, segurança e qualidade dos produtos elaborados e/ou manipulados.

Atualmente, a atividade desta secção é fundamentalmente a preparação de fórmulas não disponíveis no mercado e a manipulação, em condições que garantam a sua correta utilização, de outras fornecidas pela indústria. Estas preparações dirigem-se principalmente, a doentes individuais ou populações específicas para os quais a indústria não tem resposta adequada. A secção de farmacotecnia, tem assim um papel fundamental ao contribuir para a prestação de cuidados de saúde a nível hospitalar [5].

O farmacêutico responsável pela preparação do medicamento manipulado deve assegurar a qualidade da sua preparação e verificar a sua segurança, no que diz respeito às doses da(s) substância(s) ativa(s) e à existência de interações que possam pôr em causa a ação do medicamento ou a segurança do utente, tendo em conta as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia hospitalar, aprovadas pela Portaria nº594/2004, de 2 de junho [1].

O método de preparação do medicamento manipulado deve basear-se na prescrição, nos formulários galénicos, nas farmacopeias ou noutra fonte bibliográfica adequada e deve ser sempre documentado, preenchendo criteriosamente a ficha de preparação do respetivo medicamento manipulado. Na preparação destes só podem ser utilizadas matérias-primas inscritas na ficha de preparação ou noutras farmacopeias previstas na lei e desde que os medicamentos que as contenham não tenham sido objeto de qualquer decisão de suspensão ou revogação da respetiva autorização, adotada por uma autoridade competente para o efeito. Para garantir a boa qualidade do medicamento manipulado deve

proceder-se a todas as verificações necessárias no final da preparação, incluindo, no mínimo, a verificação dos caracteres organoléuticos, sendo que os resultados dos ensaios de verificação efetuados devem ser registados na respetiva ficha de preparação do medicamento manipulado. Deve ainda ser definido um prazo de utilização para cada medicamento, que é atribuído tendo em conta a bibliografia existente na farmácia [1].

Além de todo o processo de preparação, é necessário elaborar um folheto informativo direcionado ao doente, onde se descreva a composição e as precauções de utilização. Assim, no ato da dispensa de um medicamento manipulado, deve ser facultado ao doente uma informação completa, de modo a garantir a sua adesão à terapêutica e a promover a correta utilização do medicamento, assim como o seu uso racional [1].

2.2.2. Razões e vantagens do seu uso

O doente, enquanto elemento central de todo o sistema de saúde, deve ter acesso aos medicamentos mais adequados ao seu perfil fisiopatológico, os quais poderão ser produzidos pela indústria farmacêutica ou preparados em pequena escala pelos farmacêuticos comunitários ou hospitalares [1, 6].

Atualmente, verifica-se um aumento gradual da solicitação para solucionar problemas decorrentes, quer da inadequação dos medicamentos produzidos industrialmente às necessidades farmacoterapêuticas de doentes específicos, quer da inexistência de certos produtos no conjunto de medicamentos disponibilizados pela indústria farmacêutica. A preparação de medicamentos manipulados surge assim como uma possibilidade de personalizar a terapêutica de doentes específicos [1, 6].

Ocasionalmente, os medicamentos industrializados [7]:

- Incluem excipientes não tolerados por alguns doentes;
- Não apresentam as dosagens adequadas às suas necessidades específicas;
- Não se apresentam nas formas farmacêuticas mais apropriadas.

No caso dos doentes não tolerarem certos excipientes de medicamentos industrializados, procede-se à preparação de medicamentos personalizados, isentos de certos componentes com o objetivo de evitar a ocorrência de reações alérgicas. Por vezes, outras populações especiais, como os diabéticos e os doentes com deficiências

enzimáticas congénitas também requerem a preparação personalizada de medicamentos [1, 6].

Estando os medicamentos industrializados necessariamente limitados a um certo número de dosagens e de formas galénicas, é relativamente frequente a não existência no mercado do medicamento apropriado às necessidades específicas de um doente em concreto. Frequentemente, em Pediatria, Geriatria, Dermatologia, Gastroenterologia, Oncologia e nos casos de doentes com necessidades específicas como insuficientes renais, hepáticos ou dificuldade de deglutição, a indústria farmacêutica não tem resposta adequada, apresentando-se os medicamentos manipulados como a melhor opção para uma terapia personalizada e ajustada. Tendo em conta o número limitado de especialidades farmacêuticas disponíveis para uso pediátrico é muito comum a preparação de medicamentos manipulados apresentados sob as formas farmacêuticas mais adequadas para administração em doentes pediátricos e simultaneamente fáceis de dosear. Com efeito, na farmacoterapia pediátrica, é frequente a necessidade de administrar substâncias ativas que apenas são disponibilizadas pela indústria farmacêutica sob a forma de medicamentos para adultos. Além disso, em pediatria é importante promover a adesão à terapêutica, especialmente quando esta é prolongada. Por este motivo, é muito vantajoso poder preparar um medicamento manipulado com características organoléticas que ofereçam um sabor e um aroma agradáveis [1, 6].

Em situações em que a via oral se encontra comprometida, é importante a possibilidade de se adequar a forma farmacêutica do medicamento às necessidades individuais do doente, sendo necessário, na maioria dos casos, proceder à preparação de formas farmacêuticas suscetíveis de serem administrados pelas vias disponíveis [1, 6].

Existem várias substâncias ativas de utilidade terapêutica comprovada cujas especialidades farmacêuticas, por motivos diversos, mas por vezes exclusivamente económicos, são descontinuadas pela indústria ou não chegam a ser introduzidas no mercado. Enquadram-se nesta última situação, as substâncias ativas designadas órfãs, para as quais a produção industrial de especialidades farmacêuticas não é economicamente rentável, por se destinarem a um número reduzido de doentes. A manipulação de medicamentos assume uma especial relevância neste domínio específico e também, globalmente, no preenchimento de nichos não ocupados pela indústria farmacêutica [6].

Em suma, os medicamentos manipulados são imprescindíveis para inúmeras situações, apresentando as seguintes vantagens [5]:

- **Natureza Económica:** o medicamento manipulado é fabricado na quantidade exata e durante o tempo de tratamento adequado a cada doente, evitando desperdícios e custos desnecessários;
- **Qualidade:** a qualidade dos medicamentos manipulados é garantida, visto obedecer a uma rigorosa legislação e às normas de Boas Práticas de Manipulação;
- **Associação de substâncias:** a manipulação de medicamentos possibilita promover associações de substâncias ativas indisponíveis no mercado dos medicamentos industrializados, desde que essas associações se justifiquem do ponto de vista farmacoterapêutico. Este fator, para além de facilitar o tratamento, visto que o médico prescreve apenas um único medicamento para ser manipulado e administrado, contribui para uma maior adesão à terapêutica por parte do doente;
- **Medicamentos não disponíveis:** os medicamentos manipulados assumem especial importância para as substâncias ativas com utilidade terapêutica comprovada, mas cujas especialidades farmacêuticas, por diversos motivos, são descontinuadas pela indústria ou não chegam a ser introduzidas no mercado. Por outro lado, nos doentes hipersensíveis/alérgicos a determinados excipientes industrializados, torna-se útil a preparação de medicamentos personalizados, isentos destes excipientes;
- **Individualização das dosagens:** a indústria farmacêutica oferece os medicamentos em dosagens padronizadas. Estas dosagens nem sempre atendem a todas as necessidades. Nestas situações, torna-se imprescindível a personalização e adequação da terapêutica às necessidades e características individuais, tais como idade, altura e peso, através da preparação individualizada de medicamentos com as dosagens pretendidas;
- **Forma farmacêutica adequada:** no que diz respeito ao tratamento sistémico de doenças, a indústria farmacêutica produz, habitualmente, um reduzido leque de formas farmacêuticas por substância ativa, geralmente uma forma oral sólida (cápsula ou comprimido) e/ou formas farmacêuticas injetáveis. As dificuldades técnicas, que, em certos casos, impedem a obtenção de medicamentos líquidos

para administração oral com prazos de validade alargados, têm contribuído para a inexistência deste tipo de formas farmacêuticas. Uma característica importante dos medicamentos manipulados é a possibilidade de preparação e dispensa de formas farmacêuticas variadas. Este aspeto assume particular importância quando a via oral se encontra comprometida ou existem dificuldades em deglutir, por permitir efetuar a preparação de formas farmacêuticas a fim de serem administradas pelas vias disponíveis, como soluções ou suspensões orais, supositórios ou comprimidos sublinguais.

2.2.3. Estabilidade

Quando se prepara um medicamento manipulado depreende-se que este irá ser utilizado logo após a sua dispensa e apenas durante o período de tratamento a que o doente está sujeito. No entanto, o medicamento manipulado deverá manter-se estável e eficaz durante todo o tempo do tratamento [8].

A estabilidade de um medicamento pode ser definida como a capacidade da forma galénica para manter, dentro de limites especificados e durante o seu período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas e características que possuía no momento do seu fabrico [8].

A caracterização da estabilidade de um fármaco está legislada, pelo que um fármaco é considerado adulterado se não reunir as características de qualidade e pureza que é suposto ter [9].

De acordo com a Farmacopeia Americana (USP32/NF27) podem-se distinguir 5 tipos gerais de estabilidade [5, 6]:

- **Química:** Cada ingrediente ativo mantém a sua integridade química e potência rotulada, dentro de limites especificados. A estabilidade química dos excipientes também deve ser assegurada. É a mais importante e de mais fácil avaliação;
- **Física:** Manutenção das propriedades físicas originais, incluindo a aparência, sabor, odor, pH, viscosidade, dureza, uniformidade, dissolução e suspensão;
- **Terapêutica:** O efeito terapêutico permanece inalterado;
- **Toxicológica:** Não ocorre aumento significativo na toxicidade;

- **Microbiológica:** Esterilidade ou resistência ao crescimento bacteriano é mantida de acordo com os requisitos especificados. Os agentes antimicrobianos que estão presentes mantêm a sua eficácia dentro de limites especificados.

A instabilidade descreve reações químicas que são irreversíveis e que resultam em produtos químicos distintos, ou seja, em produtos de degradação que podem ser terapêuticamente inativos e/ou que apresentem um nível de toxicidade mais elevado que as substâncias que lhes deram origem. A instabilidade sempre foi uma preocupação e um requisito inerente à produção de medicamentos [8, 10].

Os requisitos impostos pelas agências reguladoras devem ser cumpridos, assegurando que as características iniciais se mantenham até ao momento de administração, de modo a manter a segurança e eficácia do medicamento [6].

Desta forma, os estudos de estabilidade desempenham um papel fulcral no desenvolvimento de medicamentos, de forma a garantir a qualidade do produto final [9].

2.2.3.1. Fatores que influenciam a estabilidade e formas de prevenir a instabilidade

Todos os medicamentos se alteram, podendo essas alterações dever-se a [6, 9, 10]:

- **Fatores externos:** fatores ambientais que estão diretamente ligados a condições de stock, transporte e armazenamento, tais como o pH, temperatura, luz, humidade, oxigénio e dióxido de carbono;
- **Fatores internos:** fatores inerentes à formulação, ou seja, relacionados com a sua própria natureza e à dos seus componentes, tais como interações entre fármacos, entre fármacos e os solventes e/ou adjuvantes, compostos dos recipientes, presença de impurezas, força iónica e constante dielétrica.

As alterações podem ocorrer rapidamente ou mais lentamente, podendo-se manifestar nas características organolépticas, sendo estas mais graves, visto que não são detetadas facilmente. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade do medicamento ou à formação de produtos que possuem maior toxicidade do que o fármaco que lhes deu origem [9].

De seguida, encontram-se apenas abordados os fatores ambientais estudados experimentalmente, a temperatura, a luz e o oxigénio.

Temperatura

A temperatura é o fator ambiental mais importante, influenciando diretamente a estabilidade de um fármaco, pois promove um aumento da velocidade das reações [9].

Em decorrência, um mesmo produto pode apresentar diferentes tempos de vida útil (*shelf life*) dependendo das condições ambientais do lugar onde esteja armazenado. Este efeito da temperatura pode ser representado pela equação sugerida por Arrhenius, Equação 2-1 [6, 10]:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (\text{Equação 2-1})$$

onde:

k – Constante de velocidade de reação;

A – Fator de frequência;

E_a – energia de ativação;

R – Constante dos gases perfeitos;

T – Temperatura absoluta.

Como é possível observar através das relações descritas na fórmula, um aumento da temperatura resulta num aumento da velocidade de reação ou da velocidade de degradação do fármaco [6, 10].

A representação de Arrhenius (ln k vs. 1/T), demonstrada na Figura 2-1, permite prever a estabilidade de numerosos fármacos, já que permite extrapolar a velocidade de reação a uma dada temperatura. Este princípio constitui a base dos ensaios acelerados de estabilidade de fármacos [6, 10].

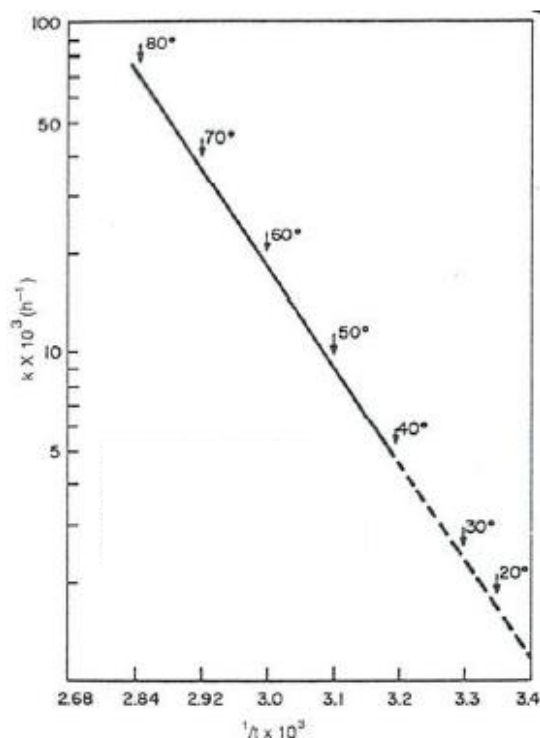


Figura 2-1: Influência da temperatura sobre a velocidade de degradação (adaptado de [9]).

A maioria das reações ocorre mais rapidamente a temperaturas mais elevadas do que a temperaturas mais baixas. A velocidade de uma reação duplica por cada aumento de 10° da temperatura. Contudo, este aumento não se aplica à maioria dos casos, sendo necessário estabelecer protocolos de estudo de estabilidade para cada formulação [9].

É natural assumir que os processos ocorrem da mesma forma, para temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas. Contudo, isso nem sempre se verifica, o que acarreta algumas dificuldades na aplicação da equação de Arrhenius para a previsão de estabilidade [9].

O efeito da temperatura pode ser minimizado selecionando a temperatura adequada de transporte, armazenamento, refrigeração ou congelamento. Desta forma, conhecer os riscos reais do tempo de exposição do medicamento a determinadas temperaturas seria a condição ideal para o desenvolvimento de medidas de prevenção de desvios da qualidade do medicamento até ao seu uso [6, 10].

Luz

É desejável que todas as substâncias utilizadas para a produção de medicamentos, sejam investigadas para verificar se são reativas à luz, devido à possibilidade de os produtos formados serem tóxicos. Contudo, o facto de as moléculas serem reativas sob certas condições, não implica que sejam sensíveis a alterações durante condições normais de armazenamento ou utilização [9].

Em determinados comprimentos de onda, a luz pode fornecer a energia de ativação necessária para desencadear reações de degradação tais como oxidação e redução, rearranjo de anéis, polimerização, rupturas de ligações, isomerizações e racemizações e promover a instabilidade farmacêutica. Existem moléculas que não absorvem significativamente a luz ambiente, quer seja solar ou artificial, mas são sensíveis a radiações com menores comprimentos de onda, absorvendo na zona do visível e ultravioleta [9, 10].

A qualidade do medicamento poderá estar comprometida quando o armazenado nas prateleiras das farmácias não é o adequado. Essa condição, além do calor, também pode proporcionar decomposição fotoquímica provocada pela exposição a raios ultravioletas [10].

Este efeito pode ser minimizado armazenando os fármacos em recipientes próprios que sejam resistentes à luz. Para evitar a fotodecomposição, os fármacos fotossensíveis ou os medicamentos formulados com esses fármacos devem ser manipulados sob luz controlada, acondicionados em frascos âmbar ou opacos, *blisters* de alumínio, PVC, entre outros. Durante a administração de fármacos sensíveis à luz, estes podem e devem ser cobertos com folhas de alumínio ou invólucros de vidro âmbar [6, 10].

Também é possível incorporar na preparação, aditivos que absorvem a radiação, através da competição com o princípio ativo [9].

A fotodegradação de fármacos depende muito das propriedades espectrais da substância, como também da distribuição espectral da fonte de luz [9].

É importante salientar que a cinética das reações fotoquímicas é mais complexa do que a das reações térmicas, pois depende de um maior número de variáveis [9].

Oxigénio

O oxigénio existe em vários estados, sendo o mais usual a forma molecular O_2 , a qual pode ser excitada pela luz, originando o anião superóxido (O_2^-). O oxigénio após oxidação pode originar outras espécies capazes de catalisar reações de oxidação, tal como representado nas Figuras 2-2 e 2-3 [9].

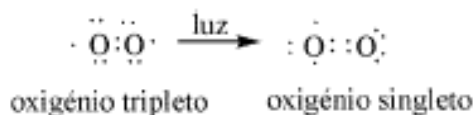


Figura 2-2: Passagem do oxigénio tripleto a oxigénio singleto pela ação da luz (adaptado de [9]).

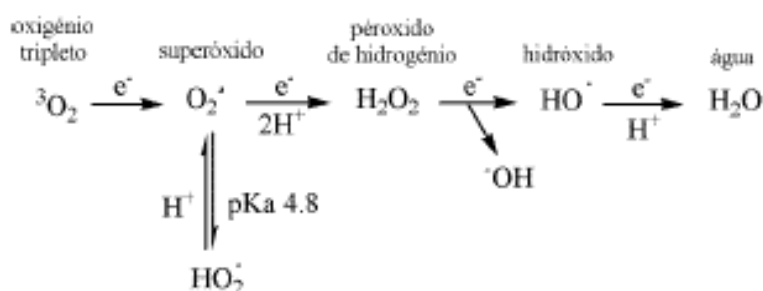


Figura 2-3: Diferentes espécies de oxigénio (adaptado de [9]).

O oxigénio pode induzir a degradação do fármaco por oxidação, que depende não só do contacto com o oxigénio, mas também da sua concentração e da fotodegradação, isto é, a presença de várias espécies deste elemento, outros radicais, iões metálicos e pressão elevada de oxigénio [5, 7, 9].

Esta degradação pode ser minimizada preenchendo o recipiente onde se encontra a preparação o mais possível, diminuindo o espaço livre que possui, ou então preenchendo esse espaço com adição de azoto. Outras opções são adicionar um agente antioxidante ou quelante à formulação, de modo a inibir a propagação das cadeias de reação, através da interação com os radicais livres; reduzir a temperatura durante o período de armazenamento; utilizar recipientes herméticos e dar preferência ao uso de recipientes unidose [5, 7, 9].

2.2.3.2. Mecanismos de degradação

O conhecimento dos mecanismos de degradação dos fármacos, que conduzem à instabilidade das preparações, é fundamental para a escolha dos componentes a utilizar na preparação de um medicamento manipulado, de forma a minimizar possíveis interações que possam comprometer a eficácia, qualidade e segurança deste mesmo medicamento. Podem destacar-se duas principais vias de degradação, as químicas e as físicas [8].

A degradação química será a única abordada, visto que foi a única via de degradação estudada experimentalmente ao longo deste projeto.

Degradação Química

A instabilidade química está sempre associada a uma perda de potência e de qualidade do fármaco. A identificação dos produtos de degradação permite um melhor conhecimento da cinética de degradação, assim como conhecer as condições para melhorar a sua estabilidade [5].

Os compostos utilizados na preparação de medicamentos têm diversas estruturas químicas, e como tal, estes estão sujeitos a várias vias de degradação química. As possíveis vias de degradação química incluem a hidrólise, oxidação, racemização e epimerização, desidratação e fotodegradação. No entanto, as vias de degradação mais comuns são a hidrólise e a oxidação [8].

- **Hidrólise**

A hidrólise é uma das reações de degradação mais comumente observada em produtos farmacêuticos, pois muitos fármacos possuem na sua estrutura grupos funcionais como ésteres, amidas e lactonas que são suscetíveis a hidrólise. A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação, gerando quebra da molécula do fármaco [10].

As reações de hidrólise geralmente são dependentes do pH e são catalisadas por iões hidrogénio (catálise ácida específica) ou iões hidróxido (catálise básica específica) e também por outras espécies ácidas ou básicas, que frequentemente encontramos nas soluções tampão. Em termos práticos, quando ocorre hidrólise de um fármaco, verifica-se a diminuição da concentração do princípio ativo e o aumento dos produtos de degradação. O processo de hidrólise é provavelmente a causa mais importante de decomposição dos fármacos quando formulados no estado líquido, e, portanto, em contacto direto com a água [6, 8, 9].

A alteração de alguns fatores pode contribuir para diminuir a hidrólise dos fármacos [5, 7, 9]:

- **pH:** a solução de um fármaco deve ser preparada de forma, a que o seu pH seja o mais próximo possível da estabilidade máxima da substância. O intervalo de pH para que ocorra o mínimo de degradação depende, geralmente, do ião com maior importância na reação;
- **Solvente:** A quantidade de água presente é de extrema importância para a velocidade da reação. Em meio aquoso, no caso de a velocidade da reação ser rápida, uma forma de a diminuir consiste em substituir a água por solventes não aquosos com constantes dielétricas menores;
- **Complexação:** A velocidade a que ocorre a degradação hidrolítica pode ser alterada de duas maneiras, pela formação de complexos ou por efeitos estéricos ou polares. O primeiro processo retarda a ocorrência de hidrólise, aumentando a estabilidade do fármaco e o segundo pode aumentar ou diminuir a velocidade com que este fenómeno ocorre;
- **Tensioativos:** A utilização de tensioativos (aniónicos, catiónicos e não iónicos) leva à estabilização do fármaco, no que diz respeito à degradação hidrolítica. Contudo, verifica-se uma estabilização superior aquando da utilização de tensioativos aniónicos ou catiónicos;
- **Modificação na estrutura química:** A adição de substituintes pode originar uma diminuição da velocidade na reação de degradação. Substituintes adicionados à cadeia alquilo ou acilo permitem retardar a ocorrência do processo de hidrólise em ésteres alifáticos e aromáticos.

Na Figura 2-4 é apresentado como exemplo a reação de hidrólise do ácido acetilsalicílico em ácido salicílico [10].

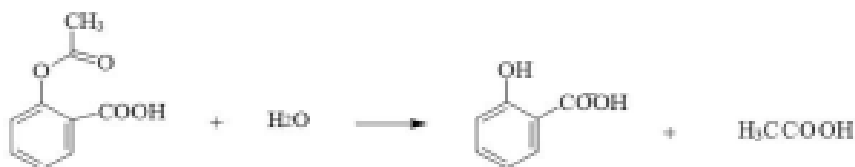


Figura 2-4: Reação de hidrólise do ácido acetilsalicílico em ácido salicílico (adaptado de [10]).

• Oxidação

O oxigénio participa na maioria das reações oxidativas, sendo este um elemento abundante no ambiente ao qual os fármacos estão expostos, durante a sua produção ou armazenamento. Os processos oxidativos são umas das principais causas de instabilidade dos fármacos, contudo, tal nem sempre implica que ocorra adição de oxigénio e/ou eliminação de hidrogénio. Diz-se que uma substância se oxidou quando perde eletrões [9].

Este tipo de alteração afeta vários tipos de fármacos como os aldeídos, álcoois, fenóis, açúcares, alcaloides, óleos e gorduras insaturadas. O processo oxidativo envolve frequentemente a presença de radicais livres, que são moléculas ou átomos que possuem um ou mais eletrões desemparelhados, como é o caso do ião superóxido (O_2^-) e do radical livre hidroxilo (OH^\cdot). Muitas das modificações oxidativas em preparações farmacêuticas são auto-oxidações que ocorrem espontaneamente sob a influência do oxigénio atmosférico, sendo estas, inicialmente, reações lentas, mas que vão sendo cada vez mais rápidas ao longo do tempo. Este é um tipo de reação em cadeia que se inicia com a ligação do oxigénio à molécula do fármaco e prossegue com o radical livre desta molécula oxidada, que participa na destruição de outras moléculas de fármacos [5, 7].

A estabilidade dos fármacos pode ser aumentada, modificando fatores como por exemplo [9]:

- **Conteúdo em oxigénio:** A maior parte das degradações por oxidação verifica-se em soluções aquosas. Posto isto, a quantidade de oxigénio presente na água é de extrema importância. Como grande parte das degradações pode ocorrer por auto-oxidação, deve-se ter em atenção a quantidade de oxigénio presente, como também se torna necessário recorrer ao uso de antioxidantes e agentes quelantes, os quais têm a função de evitar a degradação dos fármacos por oxidação;

- **Antioxidantes:** A oxidação pode ser inibida recorrendo-se ao uso de antioxidantes, também designados de catalisadores negativos, que são frequentemente utilizados em produtos farmacêuticos que sofrem reações mediadas por radicais livres. Estes atuam quebrando as cadeias formadas durante a fase de propagação, através do fornecimento de um átomo de hidrogénio ou de um radical livre, os quais adquirem a energia que a molécula ativada possui. O antioxidante ideal deve ser estável, eficaz num intervalo amplo de pH, solúvel na sua forma oxidada, incolor, atóxico, não volátil, não irritante, eficaz em baixas concentrações, termoestável e compatível com os componentes da formulação;
- **Agentes quelantes:** Denominados também de catalisadores negativos, isto porque, formam quelatos com os metais pesados evitando que estes desempenhem o seu papel de catalisadores positivos no processo oxidativo. Têm também como função aumentar a eficácia dos antioxidantes;
- **Solvente:** A substituição da água por outros solventes neste processo de degradação, não ocorre de forma linear, pois existem determinados solventes que funcionam como catalisadores nas reações oxidativas, quando associados com a água ou mesmo quando usados isoladamente;
- **pH:** Soluções que contenham constituintes facilmente oxidáveis a pH ácido devem ser tamponadas. Todavia a determinação do pH ideal para se alcançar uma estabilidade máxima, deve ser determinado de forma individual e experimentalmente para cada fármaco.

2.2.4. Prazo de Utilização

A determinação do prazo de validade de um medicamento é designada de estudo de estabilidade, sendo a sua realização indispensável por parte da indústria farmacêutica no desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Estes estudos têm como finalidade o fornecimento de evidências de como a qualidade de um produto farmacêutico varia com o tempo sob a influência de fatores ambientais tais como temperatura, humidade, luz, e ar atmosférico. Contudo, estes estudos implicam longos períodos de armazenamento sob condições controladas de temperatura e humidade. Geralmente, são realizados em câmaras ou em salas climáticas, com controlo de temperatura e de humidade relativa e devidamente qualificadas e validadas para garantir a homogeneidade e a distribuição da

temperatura e da humidade em todos os pontos em que as amostras ficam acondicionadas durante o estudo [10].

Quando um farmacêutico prepara um medicamento manipulado, este tem de lhe atribuir um prazo de utilização. É importante distinguir-se prazo de utilização de prazo de validade [3, 5, 7]:

- **Prazo de utilização:** é uma estimativa do intervalo de tempo, em que é expectável que o medicamento manipulado retenha as características e os padrões de qualidade pré-definidos, com base num conjunto de normas gerais, referências literárias ou estudos de estabilidade em tempo real, usando-se o medicamento manipulado em questão;
- **Prazo de validade:** é uma projeção do período, no qual se pode esperar que um produto farmacêutico retenha a sua pureza e potência dentro das especificações estipuladas, com base em estudos de estabilidade acelerada.

Os medicamentos manipulados não devem ser usados após o prazo de validade, uma vez que não se pode garantir a estabilidade, qualidade, eficácia e segurança dos mesmos, podendo colocar-se em risco a saúde do doente [5, 7].

A perda de princípio ativo não deve exceder os 10% ou 15%, quando armazenado sob determinadas condições [9].

A atribuição dum período de utilização não é fácil e depende de vários aspetos específicos inerentes à produção do medicamento manipulado em si, devendo ter-se em atenção [5, 7, 8]:

- que se trata de preparações extemporâneas cuja aplicação deverá ser efetuada num curto espaço de tempo;
- a forma farmacêutica (soluções aquosas são mais suscetíveis à degradação);
- o fármaco (tipo de mecanismos de degradação);
- as associações de substâncias ativas;
- os excipientes (presença de conservantes, antioxidantes);
- o tipo de embalagem;
- as características físico-químicas das substâncias ativas a utilizar e as suas cinéticas de degradação;

- a compatibilidade entre as substâncias ativas e destes com os excipientes e veículo;
- a compatibilidade do manipulado com o material de embalagem;
- o uso de conservantes;
- os equipamentos utilizados;
- as condições de armazenamento;
- o tempo de duração da terapêutica a que o doente está sujeito;
- a data de validade de produtos comerciais similares;
- literatura publicada sobre a formulação a preparar.

O Formulário Galénico Português aborda o tema da atribuição de prazos de utilização, indicando algumas normas gerais para o efeito. Quando a literatura científica não disponibiliza dados relativos à estabilidade de um medicamento manipulado, tornam-se imprescindíveis algumas regras para a atribuição de prazos de utilização dos produtos. De acordo com o Formulário Galénico Português, recomenda-se os seguintes prazos de utilização para os medicamentos manipulados não estéreis, conservados em embalagens bem fechadas, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, exceto se houver indicação em contrário [5, 7]:

- **Preparações líquidas não aquosas e Preparações sólidas:** Se a origem da substância ativa for um produto industrializado, o prazo de utilização do medicamento manipulado será igual a 25% do tempo que resta para expirar o prazo de validade do produto industrializado. Caso o período de utilização calculado seja superior a 6 meses, dever-se-á adotar um período de utilização de 6 meses;
- **Preparações líquidas que contêm água, preparadas com substâncias ativas no estado sólido:** No caso destas preparações, o período de utilização do medicamento manipulado não deverá ser superior a 14 dias, devendo estas preparações ser conservadas no frigorífico;
- **Restantes preparações:** O período de utilização dos medicamentos manipulados deverá corresponder à duração do tratamento, sem nunca ultrapassar o prazo de utilização máximo de 30 dias.

2.2.5. Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade é algo indispensável quando se preparam medicamentos manipulados. Desta forma, para a sua produção, deve ser implementado um programa eficaz de controlo de qualidade, que assegure que os mesmos são corretamente preparados e permanecem estáveis durante todo o período de utilização [8].

Durante a preparação dum medicamento manipulado, devem ser criados registos de todos os passos realizados e fazer constantes verificações, de forma a garantir que nenhum erro ocorreu [8].

Deve também existir um protocolo escrito para a sua preparação que assegure a identidade, potência, qualidade e pureza da preparação, no qual deve constar [8]:

- uma lista de matérias-primas a usar;
- as quantidades;
- a ordem em que devem ser misturados os compostos;
- uma descrição detalhada do processo de manipulação;
- a lista de equipamentos a usar;
- as embalagens apropriadas de acordo com o manipulado a preparar;
- a informação sobre estabilidade relacionada com a preparação.

Para um correto controlo de qualidade, o laboratório deverá estar devidamente equipado para a preparação de medicamentos manipulados, bem como para a realização de testes de controlo. A Portaria nº594/2004, de 2 de junho, indica a lista de equipamentos obrigatórios, a existir nestes laboratórios. As Boas Práticas de Fabrico também mencionam que os equipamentos devem ser controlados e calibrados periodicamente, a fim de assegurar a exatidão das medidas [8].

As Boas Práticas de Fabrico indicam que devem ser realizados testes de controlo, para garantir a qualidade final do medicamento manipulado, como a verificação das características organoléticas do produto semiacabado. Os ensaios não destrutivos a realizar, segundo a forma farmacêutica, são os seguintes [8, 11]:

- **Formas farmacêuticas sólidas:** uniformidade de massa;
- **Formas farmacêuticas semissólidas:** medição do pH;
- **Soluções não estéreis:** transparência e medição do pH:

- **Soluções injetáveis:** verificação de partículas em suspensão, medição do pH, verificação do fecho das ampolas, doseamento e verificação da esterilidade.

Os produtos semiacabados devem ainda satisfazer os requisitos estabelecidos na monografia genérica da Farmacopeia Portuguesa para a respetiva forma farmacêutica. Deve ser efetuada uma verificação final da massa ou volume de medicamento a dispensar, o qual deve corresponder à quantidade ou ao volume prescrito. Os resultados destas verificações devem ser registados na respetiva ficha de preparação do medicamento manipulado. Nessas monografias genéricas, estão especificados mais alguns ensaios a realizar para garantir a qualidade das formas farmacêuticas [8, 11].

2.2.6. Enquadramento Legal

A legislação portuguesa dispensa os medicamentos manipulados da apresentação de processos de pedido de Autorização de Introdução no Mercado (AIM). No entanto, os medicamentos manipulados dispõem de legislação própria [1].

A necessidade de se exigir, cada vez mais, uma inequívoca garantia da qualidade das preparações efetuadas, deu origem à publicação de um conjunto de legislação e regulamentação que procedeu à revisão do regime técnico-jurídico aplicável aos medicamentos manipulados, sendo este regime disperso e ambíguo [5].

Assim, o quadro legislativo que regulamenta o medicamento manipulado sofreu uma reestruturação em 2004, com conseqüente modernização de conceitos, alargamento de âmbitos de aplicação, clarificação de responsabilidades/competências e padronização de processos. Este novo quadro normativo tem como objetivo o reforço da salvaguarda da saúde pública na utilização destes medicamentos, através da garantia da qualidade, segurança, eficácia e credibilidade dos mesmos, revalorizando-os e tentando dar-lhes o papel relevante que assumem dentro da terapêutica medicamentosa [5, 12].

- **DL n.º 90/2004, de 20 de abril:** Redefine os conceitos de preparado oficial e fórmula magistral, clarifica a aplicabilidade do diploma aos serviços farmacêuticos hospitalares, permite a contratação da preparação de manipulados oficiais a outras entidades pela farmácia hospitalar, altera o regime de participação de manipulados [12];

- **DL n.º 95/2004, de 22 de abril:** Regula a prescrição e preparação de medicamentos manipulados, clarifica responsabilidades relativas à eficácia, segurança e qualidade dos mesmos e aumenta a intervenção da autoridade regulamentar. Estes medicamentos podem ser objeto de uma preparação antecipada desde que:
 - constem da lista aprovada pelo Infarmed;
 - assumam a forma de preparação multidoses;
 - e sejam distribuídos em embalagens de dose única [1, 4].
- **Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho:** Aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar [12];
- **Portaria n.º 709/2004, de 2 de junho:** Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar [12];
- **Portaria n.º 769/2004, de 2 de junho:** Estabelece que o cálculo do preço de venda ao público dos medicamentos manipulados por parte das farmácias é efetuado com base no valor de honorários da preparação, no valor das matérias-primas e no valor dos materiais de embalagem [12];
- **Deliberação n.º 1497/2004, de 7 de dezembro:** Define as condições exigidas aos fornecedores de matérias-primas para a prescrição e a preparação de medicamentos manipulados [12];
- **Deliberação n.º 1498/2004, 7 de dezembro:** Define o conjunto de substâncias cuja utilização na preparação e prescrição de medicamentos manipulados não é permitida, bem como as condições dessa proibição [12];
- **Deliberação n.º 1500/2004, 7 de dezembro:** Aprova a lista de equipamento mínimo de existência obrigatória para as operações de preparação, acondicionamento e controlo de medicamentos manipulados, que consta do anexo à presente deliberação e dela faz parte integrante [12];
- **Deliberação n.º 1504/2004, de 7 de dezembro:** Define os formulários e farmacopeias reconhecidos pelo Infarmed [12].

A lei permite que o farmacêutico prepare e dispense medicamentos manipulados officinais por iniciativa própria. Ao farmacêutico compete a aprovação da fórmula galénica prescrita, sob o ponto de vista galénico e farmacoterapêutico e a preparação do

manipulado segundo as boas práticas de manipulação garantindo a qualidade e segurança do medicamento de preparação individual [12].

2.3. Diazóxido

O diazóxido é um derivado não diurético da benzotiadiazina originalmente formulado como um agente anti-hipertensivo na década de 1960. Era considerado como um vasodilatador periférico com capacidade de reduzir a hipertensão grave por relaxamento do músculo liso. O diazóxido foi usado pela primeira vez para tratar hiperinsulinemia congénita (CHI), sendo o tratamento primário desde então, uma vez que geralmente é bem tolerado. A hiperinsulinemia congénita é a causa mais comum e séria de persistência hipoglicemia em recém-nascidos e crianças, caracterizada pela secreção excessiva de insulina pelas células beta pancreáticas. O diazóxido é o medicamento de primeira linha e o único agente farmacológico aprovado pela Federal Drug Administration (FDA) para o tratamento do hiperinsulinismo. O seu uso aumentou ao longo dos anos para incluir pacientes com várias formas genéticas de hiperinsulinismo, hiperinsulinismo de stress perinatal e bebés de mães diabéticas [13, 14, 15, 16].

Atualmente, encontra-se na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde, como um dos medicamentos mais seguros e eficazes necessários num sistema de saúde [16].

2.3.1. Características

- **Fórmula estrutural:**

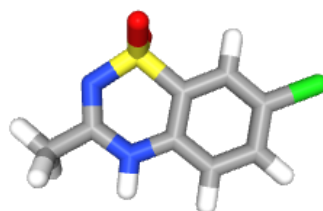


Figura 2-5: Fórmula estrutural do diazóxido em 3D (adaptado de [17]).

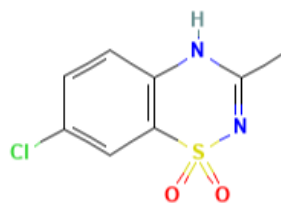


Figura 2-6: Fórmula estrutural do diazóxido em 2D (adaptado de [17]).

- **Nome IUPAC:** 7-cloro-3-metil-4H-1,2,4-benzotiazina 1,1-dióxido;
- **Número CAS:** 364-98-7;
- **Fórmula química:** C₈H₇ClN₂O₂S;
- **Massa molar:** 230,672 g/mol;
- **Descrição:** Pó cristalino branco, ou quase branco; inodoro;
- **Ponto de fusão:** 330,5°C;
- **Ponto de ebulição:** 414,8°C a 760 mmHg;
- **Solubilidade:** Praticamente insolúvel em água (0,552 g/L) e éter R; livremente solúvel em dimetilformamida R; ligeiramente solúvel em etanol (~750 g/L) TS;
- **Categoria:** Anti-hipertensivo e anti-hipoglicémico;
- **Armazenamento:** O diazóxido deve ser mantido num recipiente bem fechado;
- **Biodisponibilidade:** Facilmente absorvido após a administração oral;
- **Metabolismo:** O metabolismo do diazóxido ocorre por oxidação hepática e conjugação de sulfato;
- **Semi-Vida:** 21-45 horas;
- **Ligação plasmática:** A ligação plasmática do diazóxido é muito elevada (mais do que 90%) a proteínas do soro;
- **Excreção:** Renal [17, 18].

2.3.2. Formulações disponíveis no mercado

O diazóxido é comercializado por várias empresas farmacêuticas com as seguintes marcas: Proglycem®, Eudemine®, Glicemin®, Hypertonalum®, Proglicem®, Sefulken®, Tensuril®, Hyperstat®, Eudimine®, Mutabase® e Balila®. Os produtos

genéricos são comercializados com o nome Diazoxide. Todas as suas formulações estão disponíveis apenas sob prescrição médica [19, 20, 21, 22].

Em Portugal, de acordo com o Infarmed, o diazóxido apenas se encontra disponível em cápsulas de 25 ou 100 mg da marca Proglicem® [23].

No entanto, como este medicamento não possui AIM, nem consta no Formulário Nacional de Medicamentos (FNM), os hospitais ou outras instituições de saúde com autorização direta necessitam de efetuar uma requisição específica ao Infarmed, o qual emite uma Autorização de Utilização Excecional (AUE) com validade de um ano, permitindo ao utente o acesso a este medicamento durante este período [24].

Nesse sentido, foram identificados, pela Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica, um conjunto de medicamentos que são essenciais para o funcionamento dos hospitais e que ainda não dispõem de monografia no FNM, abrangendo as seguintes áreas terapêuticas [25]:

- Sistema nervoso central;
- Aparelho cardiovascular;
- Aparelho geniturinário;
- Hormonas e medicamentos usados no tratamento de doenças endócrinas;
- Nutrição;
- Medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores;
- Meios de diagnóstico.

O diazóxido insere-se dentro da área terapêutica das hormonas e medicamentos usados no tratamento de doenças endócrinas, tal como se pode verificar na Tabela 2-1 [25].

Tabela 2-1: Lista de medicamentos identificados pelo Infarmed relativos a pedidos de AUE de benefício clínico reconhecido (adaptado de [25]).

Hormonas e medicamentos usados no tratamento de doenças endócrinas		
Substância ativa	Forma Farmacêutica	Dosagem
Danazol	Comprimido	50 mg
Danazol	Comprimido	100 mg
Danazol	Comprimido	200 mg
Diazóxido	Cápsula	25 mg
Diazóxido	Cápsula	100 mg
Gonadorrelina	Solução injetável	0,1 mg/mL
Levotiroxina sódica	Solução injetável	0,2 mg/mL
Metirapona	Cápsula	250 mg
Tetracosactido	Solução injetável	0,25 mg/mL

Estes medicamentos não apresentam uma expressão significativa em termos de encargos para o hospital, no entanto, não deixam de ocupar uma posição de destaque quer devido à especificidade da sua aquisição, quer pelos nichos terapêuticos ocupados por muitos deles, tais como o diazóxido [26].

3. Metodologia experimental

Neste capítulo encontram-se descritas as metodologias utilizadas, assim como os reagentes, solventes, material e equipamento usados para a avaliação da estabilidade físico-química do diazóxido.

3.1. Reagentes e Solventes

O diazóxido foi adquirido à TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica), apresentando um grau de pureza superior a 98%.

Os solventes dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo e metanol apresentavam uma pureza superior a 99,9% e foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Algés, Portugal), à Honeywell|Riedel-de Haën (Saint Germain en Laye, França) e à Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, França), respetivamente.

A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e a hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD) foram adquiridas à Sigma-Aldrich (Algés, Portugal).

Os sais de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4) e o hidrocloreto de quinina dihidratado (quinino) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Algés, Portugal).

A *p*-nitrosodimetilanilina (RNO), o azul de nitro-tetrazólio (NBT) e o imidazol foram adquiridos à Alfa Aesar (Lancashire, Reino Unido).

A água ultrapura utilizada na preparação das soluções foi obtida através de um sistema Milli-Q da Millipore (Algés, Portugal) e apresentava uma condutividade inferior a $0,1 \text{ microS} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2. Equipamento e Material

No decorrer do trabalho experimental foram usados vários equipamentos analíticos de diferentes proveniências.

Para a preparação das soluções, todo o material de vidro, nomeadamente pipetas e balões volumétricos, eram da classe A ou semelhante.

Nas medições de volumes de solução foram usadas micropipetas de capacidade variável (10-100 microlitros e de 100-1000 microlitros) da marca VWR (Carnaxide, Portugal).

Na pesagem dos reagentes utilizados, recorreu-se a uma balança analítica, marca KERN & Sohn GmbH (Balingen, Alemanha), modelo ABJ-NM/ABS-N.

Para auxiliar na dissolução das soluções, utilizou-se um banho de ultrassons da marca VWR (Carnaxide, Portugal), modelo USC 100TH.

Na filtração foram utilizados filtros de seringa marca Chromafil, modelo Xtra PTFE 45/25 com porosidade de 0,45 micrómetros (μm).

Nos estudos de solubilidade foi usado um agitador orbital, marca IKA (Staufen, Alemanha), modelo KS 4000 i control.

Para as determinações espectrofotométricas foi usado um espectrofotómetro UV-Vis da Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo UV-1800 240V IVDD. Na aquisição de dados foi usado o software “UVProbe 2.42”.

Para os ensaios de fotoreatividade utilizou-se uma câmara climática com simulador solar, da marca Aralab (Rio de Mouro, Portugal), modelo Fitoclima S600PL, equipada com oito lâmpadas UV-Vis Repti Glo (20 W).

O pH da solução tampão de fosfato foi determinado usando um medidor de pH da marca Labolan (Navarra, Espanha), modelo 700P.

Nos estudos de estabilidade, usou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) e modelo UFLC, acoplado com uma bomba binária LC-20AD, um desgaseificador de solvente DGU-20A5, um detetor de fotodíodos SPD-M20A de vários comprimentos de onda. A separação foi realizada

usando uma coluna de fase reversa C18 da marca Macherey-Nagel (5 μm , 250 \times 4 mm). A fase móvel foi filtrada recorrendo a filtros de membrana de Nylon, da marca Filter-Lab, com porosidade de 0,45 micrómetros (μm).

Para os ensaios de estabilidade térmica utilizou-se uma estufa da marca J.P. Selecta, modelo 206.

Para a análise térmica dos complexos de inclusão com ciclodextrinas recorreu-se ao equipamento calorimétrico da marca NETZSCH (Selb, Alemanha), modelo STA 449 F3 Jupiter.

3.3. Escolha do solvente

Antes de se iniciar os ensaios laboratoriais foi necessária a realização de algumas experiências com o objetivo de avaliar a solubilidade do diazóxido em vários solventes, nomeadamente em DMSO, acetonitrilo e metanol, uma vez que de acordo com a literatura, o diazóxido apresenta uma baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos [18].

Prepararam-se soluções-mãe com concentração 10 mM, usando cada um dos solventes mencionados anteriormente. As soluções-mãe foram depois diluídas 100x e analisadas num espectrofotómetro UV-Vis, no intervalo de 200 a 400 nm.

3.4. Determinação da curva de calibração por espectrofotometria de UV-Vis

Para realizar o estudo de solubilidade em água desionizada, foi necessário estabelecer uma curva de calibração usando o solvente adequado.

Inicialmente, preparou-se uma solução-mãe de diazóxido, com uma concentração de 10 mM, em DMSO. Para garantir a dissolução completa, introduziu-se a solução num banho de ultrassons durante 5 minutos. A partir da solução-mãe preparou-se, por diluição, uma solução de concentração intermédia 1 mM, em DMSO.

Para o traçado da curva de calibração, prepararam-se soluções-padrão, por diluição rigorosa da solução de concentração intermédia, com concentrações entre 10 μM e 100 μM , usando como solvente uma mistura DMSO:água (1:9).

A curva de calibração foi obtida medindo a absorvância de cada uma das soluções-padrão no comprimento de onda de 266 nm. Os valores apresentados para a curva de calibração resultam da média obtida em 3 ensaios independentes.

3.5. Estabilidade físico-química do diazóxido

A estabilidade físico-química do diazóxido foi avaliada para os seguintes fatores externos: temperatura, oxigénio e luz.

3.5.1. Estabilidade térmica

Para a avaliação da estabilidade térmica do diazóxido recorreu-se ao método de HPLC. O método implementado baseou-se num procedimento, já validado, disponível na literatura [27].

Condições cromatográficas

As condições experimentais usadas são apresentadas de seguida, de forma resumida [27]:

- **Caudal:** 0,4 mL/min;
- **Volume de injeção:** 20 μL ;
- **Comprimento de onda:** 266 nm;
- **Temperatura:** 40°C;
- **Coluna:** Macherey-Nagel C18 (5 μm , 250 \times 4 mm);
- **Eluição:** isocrática;
- **Tempo de retenção:** 7 min;

- **Duração do ensaio:** 10 min;
- **Fase móvel:** mistura volumétrica de solução aquosa de fosfato de potássio monobásico, 10 mM (25%) e acetonitrilo (75%).

Determinação da curva de calibração por HPLC

Para a obtenção da curva de calibração foi preparada inicialmente uma solução-mãe de concentração 30 mM em DMSO. As soluções-padrão analisadas, no intervalo de 17 a 100 mg/L, foram preparadas através de diluições da solução-mãe em acetonitrilo. Estes padrões foram analisados no HPLC, em triplicado, usando o método descrito na literatura.

A curva de calibração foi obtida através da representação gráfica da área média dos picos em função da concentração das soluções. Os valores apresentados para a curva de calibração resultam da média obtida em 3 ensaios independentes.

As concentrações de diazóxido de cada uma das amostras estudadas foram determinadas por interpolação a partir da curva de calibração.

Estudos de estabilidade térmica

Para o ensaio de estabilidade térmica prepararam-se 3 soluções-amostra de concentração 25 mg/L em acetonitrilo, a partir de uma solução-mãe de diazóxido 15 mM, preparada em DMSO (Figura 3-1). Neste estudo foram também testadas 3 amostras sólidas de diazóxido (Figura 3-1). As amostras, líquidas e sólidas, foram armazenadas em locais específicos sob diferentes condições de temperatura: no frigorífico a 1,6°C, numa prateleira do laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e numa estufa a 37°C. A tempos pré-definidos foram retiradas alíquotas de cada um dos frascos e determinou-se a concentração de diazóxido usando a metodologia cromatográfica descrita anteriormente. As amostras foram testadas durante um período de 30 dias.



Figura 3-1: Amostras líquidas (esquerda) e sólidas (direita) usadas para o estudo da estabilidade térmica.

3.5.2. Fotorreatividade

Qualquer substância ativa ou medicamento pode ser exposto à luz natural ou artificial durante a produção, armazenamento, administração ou uso. A grande maioria das substâncias e excipientes farmacêuticos absorvem radiação UV e possivelmente visível. A absorção é uma primeira indicação de que um composto pode participar num processo fotoquímico, ou seja, ser fotorreativo, do qual pode resultar a sua própria decomposição ou a de outros componentes da formulação [28].

A consideração inicial para a avaliação do potencial fotorreativo é se um composto absorve fotões em qualquer comprimento de onda entre 290 e 700 nm. Substâncias que não possuam uma absorvidade molar superior a $1000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, em qualquer comprimento de onda entre 290 e 700 nm, não são consideradas suficientemente fotorreativas para resultar em fototoxicidade direta [28].

A excitação de moléculas pela luz pode levar à geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), incluindo o anião superóxido (SA) e o oxigénio singleto (SO), por intermédio de mecanismos de transferência de energia. Assim, a geração de ROS após irradiação com luz UV-Vis pode ser um indicador do potencial de fototoxicidade [28].

Os estudos de fotorreatividade do diazóxido foram realizados de acordo com o procedimento descrito na literatura [28].

Para determinar se o diazóxido absorve luz UV-Vis na faixa de 290 a 700 nm, foi traçado o espectro de absorção de uma solução de concentração $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, preparada em DMSO.

Como a câmara de climática utilizada nos estudos era diferente dos modelos recomendados na norma, foi necessário validar as condições de irradiação, de modo a satisfazerem os critérios recomendados. Para a otimização utilizou-se como controlo positivo, uma solução de quinino 200 μM e testados diferentes tempos de exposição à radiação a uma temperatura de 25 °C [28].

A solução-mãe de diazóxido foi preparada na concentração de 10 mM em DMSO, protegida da luz e utilizada no mesmo dia.

A análise da formação de oxigénio singlete (SO) foi detetada por medição espectrofotométrica, a 440 nm, da diminuição da absorbância de uma solução de RNO usando imidazol como aceitador seletivo de SO. As amostras, contendo o diazóxido (200 μM), RNO (50 μM) e imidazol (50 μM) no tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 7,4), foram colocadas num tubo, agitadas e colocadas num banho de ultrassons, protegidas da luz, durante 10 minutos. A mistura foi transferida para uma célula de quartzo Hellma de alta precisão antes da exposição à radiação. Em seguida, as amostras foram irradiadas na câmara climática durante 2h30 min a 25°C. Após irradiação, a absorbância das soluções foi lida novamente a 440 nm [28].

A análise da formação de anião superóxido (SA) foi realizada observando a redução de NBT a NBT^+ , que pode ser determinada espectrofotometricamente a 560 nm. As amostras contendo o diazóxido (200 μM) e NBT (50 μM) no tampão fosfato de potássio (20 mM, pH 7,4) foram irradiadas, e a redução do NBT foi medida pelo aumento da absorbância a 560 nm da mesma maneira que para a determinação de SO [28].

As determinações de SO e SA foram realizadas em duplicado.

De acordo com o resultado (média das determinações em duplicado) do ensaio ROS, as substâncias testadas são classificadas como fotorreativas quando se obtém um valor SO igual a 25 ou superior e/ou um valor SA igual a 20 ou superior; por sua vez, a substância é considerada não fotorreativa quando são registados valores inferiores a 25 para SO e inferiores a 20 para SA, conforme representado na Figura 3-2 [28].



Figura 3-2: Critérios para um produto químico seja considerado fotorreativo (adaptado de [29]).

3.6. Complexos de inclusão com CDs

As ciclodextrinas (CDs) são polímeros de estrutura cíclica de unidades de D-glupirranose, cuja característica mais notável é a capacidade para formar complexos de inclusão com muitas moléculas hóspedes, através de um fenómeno de complexação molecular [30, 31].

A utilização das CDs em formulações farmacêuticas permite aumentar a solubilidade, a estabilidade aquosa de fármacos lipofílico, diminuir a volatilidade e aumentar a sua biodisponibilidade [30, 31].

A formação dos complexos fármaco/CD é altamente condicionada pela estrutura e propriedades físico-químicas dos fármacos e das CDs, pois para que um complexo de inclusão seja formado, a molécula do fármaco tem de se ajustar total ou parcialmente no interior hidrofóbico da cavidade da molécula hospedeira, a CD [30].

3.6.1. Estudos de solubilidade em água desionizada

Os estudos de solubilidade de fase em água foram realizados de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors [32].

Começou-se por preparar soluções-mãe 30 mM de HP- β -CD e de HP- γ -CD, em água desionizada. Para auxiliar a dissolução, colocaram-se estas soluções num banho de ultrassons durante 5 minutos.

De seguida, pesou-se 30 mg de diazóxido para cada um de 5 Erlenmeyers, aos quais se adicionaram volumes crescentes da solução-mãe de CD, de modo a obterem-se soluções com concentrações de 0, 5, 10, 20 e 30 mM em ciclodextrina. Em seguida, perfez-se o volume até 25,00 mL com água desionizada (Tabela 3-1).

Durante a realização deste estudo, garantiu-se que parte da massa de diazóxido pesada permaneceu insolúvel.

Tabela 3-1: Preparação das soluções de diazóxido e CD usadas no estudo de solubilidade em água desionizada.

Solução	m diazóxido (mg)	[CD] mM	Vf (mL)	V CD (mL)	V água (mL)
1	30	0	25,00	0,00	25,00
2		5		4,17	20,83
3		10		8,33	16,67
4		20		16,67	8,33
5		30		25,00	0,00

As soluções foram protegidas da luz recobrimo os Erlenmeyers com papel de alumínio.

As soluções preparadas foram colocadas a agitar, no agitador orbital a 20°C e a 100 rotações por minuto (rpm), durante cerca de 96 horas.

Diariamente, recolheram-se alíquotas de cada uma das soluções em estudo, as quais foram filtradas, diluídas adequadamente e analisadas por espectrofotometria UV-Vis a 266 nm.

A concentração de diazóxido foi determinada por interpolação da curva de calibração.

Foram realizados ensaios em triplicado para cada uma das ciclodextrinas em estudo.

3.6.2. Preparação dos complexos de inclusão

Prepararam-se dois complexos de inclusão com a HP- β -CD: um sólido e um líquido.

O complexo sólido diazóxido/HP- β -CD foi preparado utilizando o método de *kneading*. Pesaram-se 20 mg de diazóxido e 127 mg de HP- β -CD (razão equimolar) para um almofariz e triturou-se as duas substâncias durante 15 minutos, na presença de uma quantidade adequada de etanol, até se obter uma pasta. De seguida, a mistura foi colocada num exsiccador com vácuo durante 1 dia, de forma a secar o sólido [33].

A preparação do complexo líquido diazóxido/HP- β -CD consistiu na mistura de duas soluções equimolares (5,45 mM) preparada em DMSO:água (3:7). A solução resultante foi colocada a agitar, no agitador orbital a 20°C e a 100 rpm, durante 48 horas. Por fim, a solução foi liofilizada [34].

3.6.3. Caracterização do complexo diazóxido/HP- β -CD por DSC

A análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) tem sido frequentemente utilizada na investigação da formação de complexos de inclusão no estado sólido. É considerado como um método de rotina para investigações qualitativas preliminares e rápidas, por avaliação do comportamento térmico dos fármacos isolados, das CDs e respetivos complexos preparados pelos mais variados métodos de preparação [34, 35].

O DSC permite determinar o calor absorvido ou libertado pela amostra a uma temperatura programada. Estas variações de calor resultam das alterações que se produzem num composto e que desaparecem quando está incluído numa CD [35].

A finalidade da utilização desta metodologia analítica consiste na comparação dos perfis térmicos resultantes das misturas físicas de fármaco e CD com perfis resultantes dos respetivos complexos, para que seja evidenciada ou não a ocorrência de inclusão do fármaco na cavidade da CD. Na ausência de qualquer tipo de interação entre o fármaco e a CD, as curvas de DSC resultantes deverão corresponder ao somatório das curvas de DSC dos componentes individuais. Na eventualidade da ocorrência de interações entre o

fármaco e a CD nos produtos obtidos pelas várias manipulações, as curvas de DSC deverão apresentar um perfil não coincidente com o somatório dos efeitos observados nos termogramas dos componentes isolados. Quando uma molécula hóspede é incluída na cavidade de uma CD ou na rede cristalina, os seus pontos de fusão, ebulição ou sublimação sofrem um deslocamento para temperaturas diferentes ou desaparecem do intervalo de temperaturas anterior à decomposição da respetiva CD (250-300°C) [35].

Para este estudo foram usados cadinhos de alumínio com a tampa e uma massa de amostra entre 2 e 10 mg.

De modo a evitar acumulação de gases que se possam libertar, furou-se a tampa do cadinho e, de seguida selou-se o mesmo com a tampa. Como referência, utilizou-se um cadinho de alumínio vazio.

Por fim, colocou-se os cadinhos no equipamento e iniciou-se o varrimento de acordo com as seguintes condições:

- **Gás de proteção:** azoto;
- **Caudal do gás de proteção:** 50 mL/min;
- **Gás de purga 2:** azoto;
- **Caudal do gás de purga 2:** 50 mL/min;
- **Temperatura inicial:** 40 °C;
- **Velocidade de aumento de temperatura:** 10 °C/min;
- **Temperatura final:** 600 °C.

4. Resultados e Discussão

Nesta secção encontram-se os resultados obtidos para as diversas metodologias realizadas, assim como a discussão dos mesmos.

4.1. Escolha do solvente

De acordo com a literatura, o diazóxido apresenta uma baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos. Assim, inicialmente efetuou-se uma avaliação da solubilidade do diazóxido em DMSO, acetonitrilo e metanol. [18].

Prepararam-se soluções-mãe de diazóxido 10 mM nos diversos solventes em estudo. A solução preparada em DMSO apresentava-se límpida e sem partículas em suspensão. No entanto, verificou-se que nas soluções obtidas usando os solventes acetonitrilo e metanol, a substância não se encontrava completamente dissolvida. Desta forma, optou-se por continuar o estudo somente com o solvente DMSO. A partir da solução-mãe foi preparada uma solução diluída de concentração 0,1 mM, que foi posteriormente analisada por espectrofotometria UV-Vis. Na Figura 4-1 está apresentado o espectro obtido para a solução de diazóxido 0,1 mM, preparada em DMSO.

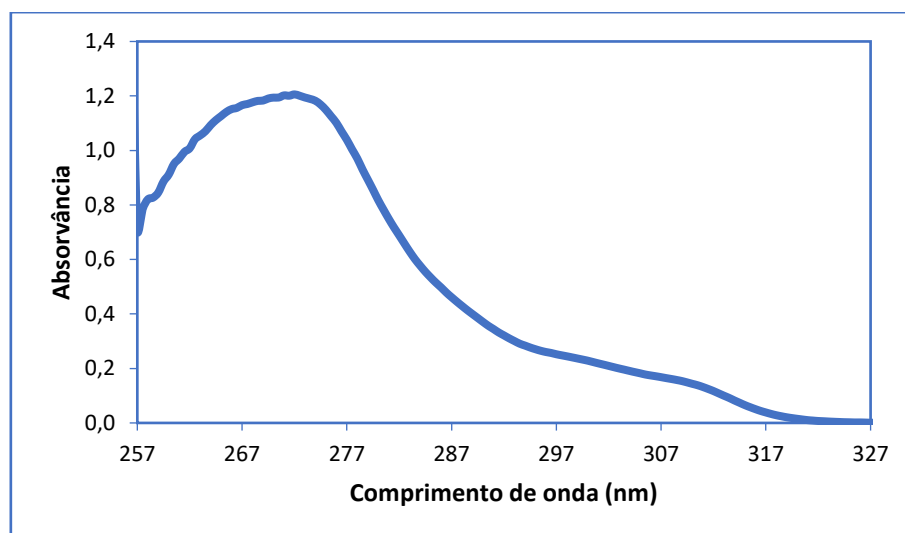


Figura 4-1: Espectro de UV-Vis da solução de diazóxido 0,1 mM preparada em DMSO.

Dado que os estudos posteriores de solubilidade envolverão obrigatoriamente o uso de água como co-solvente, foi necessário realizar mais ensaios, de modo a averiguar qual a mistura de DMSO:água mais adequada para a preparação das soluções-padrão, sem que ocorra a insolubilização do diazóxido. Para tal, prepararam-se soluções de diazóxido 0,1 mM, usando como solvente diferentes misturas DMSO:água (10:0; 5:5; 2,5:7,5; 2:8 e 1:9). Estas soluções foram analisadas por espectrofotometria de UV-Vis. Os resultados obtidos permitiram concluir que a utilização de qualquer uma destas misturas DMSO:água não influenciava significativamente os espectros e as absorvâncias obtidas comparativamente à solução preparada exclusivamente com DMSO (Tabela 4-1). Assim, optou-se por usar a mistura solvente DMSO:água (1:9) nos estudos subsequentes.

Tabela 4-1: Absorvâncias obtidas ao comprimento de onda máximo, dos espectros das soluções de diazóxido preparadas em diferentes proporções de solvente DMSO:água.

Solvente	Comprimento de onda máximo (nm)	Absorvância
DMSO:água (10:0)	272	1,303
DMSO:água (5:5)	272	1,438
DMSO:água (2,5:7,5)	272	1,417
DMSO:água (2:8)	266	1,402
DMSO:água (1:9)	266	1,504

4.2. Determinação da curva de calibração por espectrofotometria de UV-Vis

Para a obtenção da curva de calibração do diazóxido foram preparadas soluções-padrão com concentrações no intervalo de 10 a 100 μ M numa mistura DMSO:água (1:9). De seguida, traçaram-se espectros de UV-Vis, no intervalo de comprimento de onda entre os 250 nm e 300 nm, de cada uma das soluções preparadas (Figura 4-2).

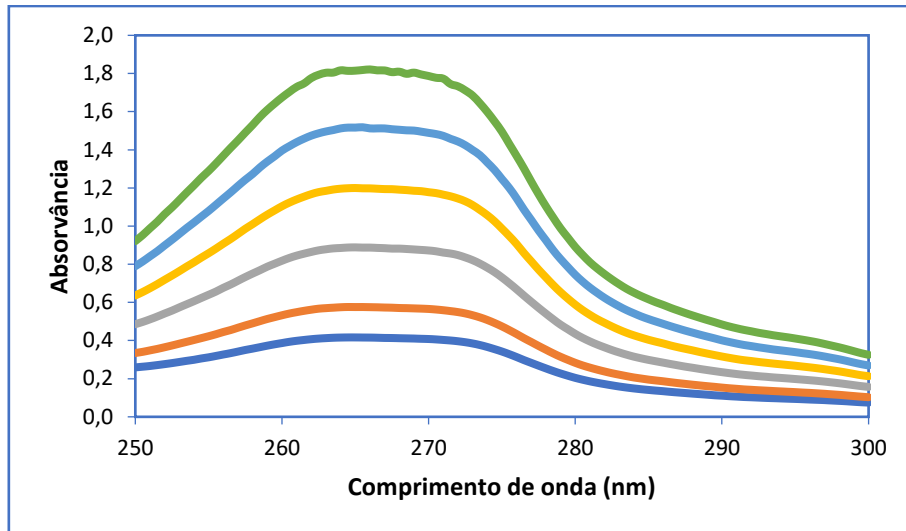


Figura 4-2: Espectros de UV-Vis das soluções de diazóxido (—) 10 μM , (—) 20 μM , (—) 40 μM , (—) 60 μM , (—) 80 μM e (—) 100 μM preparadas numa mistura DMSO:água (1:9).

Na Tabela 4-2 são apresentadas as absorvâncias obtidas, ao comprimento de onda máximo de 266 nm, para as diferentes soluções-padrão de diazóxido.

Tabela 4-2: Absorvâncias obtidas para as diferentes soluções-padrão de diazóxido (média obtida para 3 réplicas).

Solução-padrão	Concentração (mmol/L)	Absorvância a 266 nm
1	0,0101	0,417
2	0,0201	0,576
3	0,0402	0,883
4	0,0603	1,183
5	0,0805	1,505
6	0,1006	1,798

A partir dos dados obtidos, foi traçada a curva de calibração presente na Figura 4-3. Como é possível observar, existe uma correlação linear entre a absorvância a 266 nm e a concentração de diazóxido, sendo o coeficiente de correlação obtido de 0,9999.

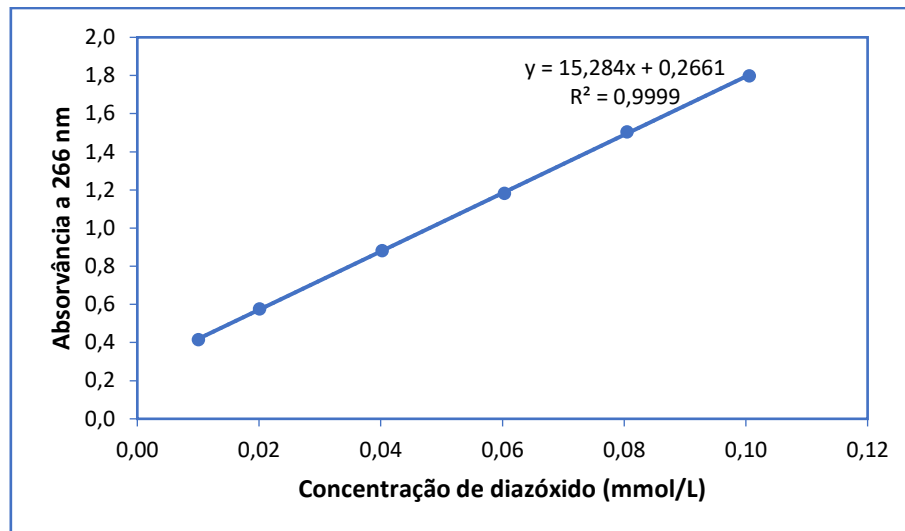


Figura 4-3: Curva de calibração obtida entre a absorvância a 266 nm e a concentração de diazóxido (mmol/L).

4.3. Estabilidade físico-química do diazóxido

Os estudos de estabilidade têm um papel fulcral no desenvolvimento de medicamentos, de forma a garantir a qualidade do produto final, nomeadamente a capacidade de um produto manter dentro de limites especificados, e durante o período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía no momento do seu fabrico/preparação.

A estabilidade físico-química do diazóxido foi avaliada tendo em consideração os fatores externos: temperatura, oxigénio e luz.

4.3.1. Estabilidade térmica

Para a avaliação da estabilidade térmica recorreu-se a uma metodologia cromatográfica descrita na literatura [27].

Para a determinação da curva de calibração começou-se por obter os cromatogramas para soluções-padrão de diazóxido com concentrações entre 17 mg/L e 100 mg/L. Na Figura 4-4 estão representados os cromatogramas obtidos para cada solução-padrão.

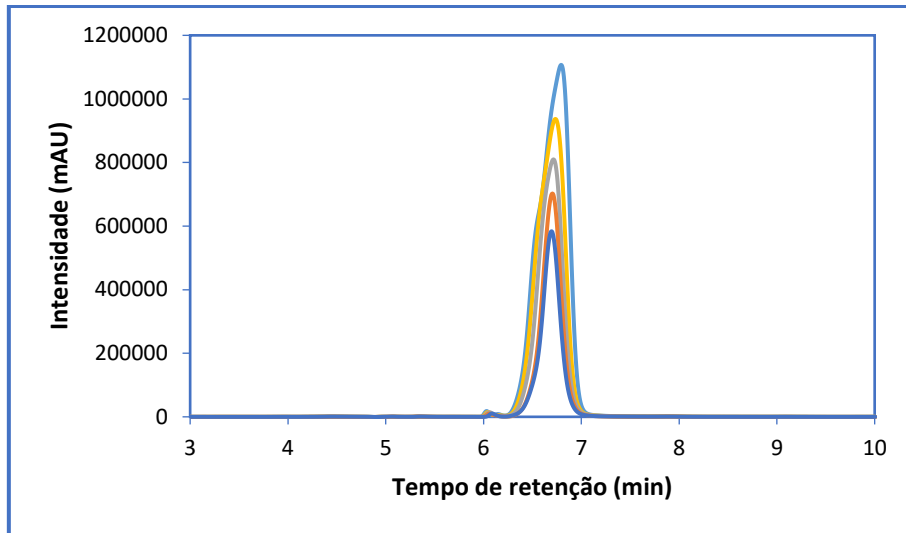


Figura 4-4: Cromatogramas obtidos para as diferentes concentrações de diazóxido (—) 17 mg/L, (—) 25 mg/L, (—) 50 mg/L, (—) 75 mg/L e (—) 100 mg/L em acetonitrilo.

Na Tabela 4-3 são apresentadas as áreas obtidas para as diferentes solução-padrão.

Tabela 4-3: Áreas dos picos obtidos para as diferentes concentrações de diazóxido (média obtida para 3 réplicas).

Solução-padrão	Concentração (mg/L)	Tempo de retenção (min)	Área
1	16,70	6,7	8113026
2	25,06	6,7	10118664
3	50,11	6,7	13735281
4	75,17	6,7	18436547
5	100,2	6,8	23658602

Através dos resultados obtidos foi traçada a curva de calibração presente na Figura 4-5, representando graficamente a área dos picos em função da concentração de diazóxido, sendo o coeficiente de correlação obtido de 0,9978.

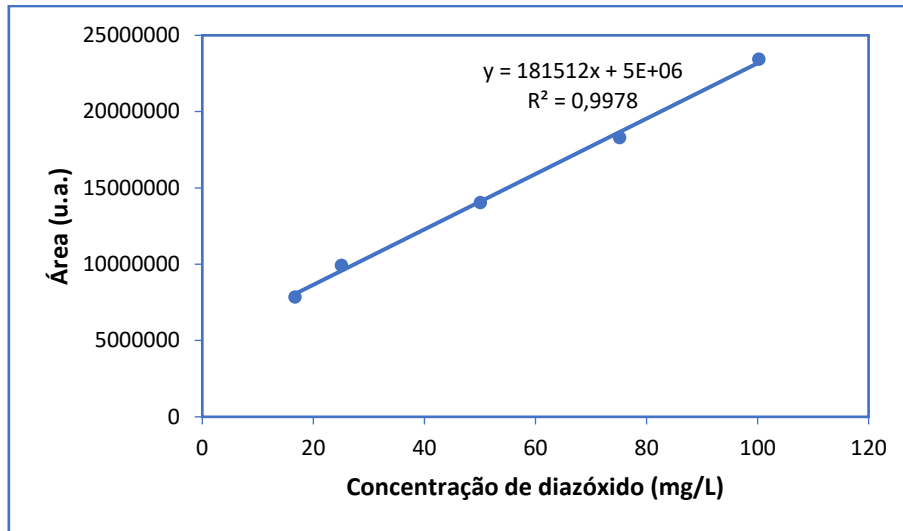


Figura 4-5: Curva de calibração obtida entre a área dos picos (u.a.) e a concentração de diazóxido (mg/L).

A estabilidade térmica do diazóxido foi avaliada em amostras líquidas e em amostras sólidas.

Para o estudo da estabilidade térmica de amostras líquidas, prepararam-se três soluções de diazóxido 25 mg/L, que foram colocadas em frascos de vidro transparente. Cada frasco foi armazenado durante 30 dias sob condições de temperatura diferentes: no frigorífico a 1,6°C, numa prateleira do laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e numa estufa a 37°C. Em tempos pré-definidos (0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias) foram retiradas alíquotas de cada um dos frascos e determinou-se a concentração de diazóxido recorrendo à metodologia HPLC previamente estabelecida.

Na Figura 4-6, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 0 e 30 dias.

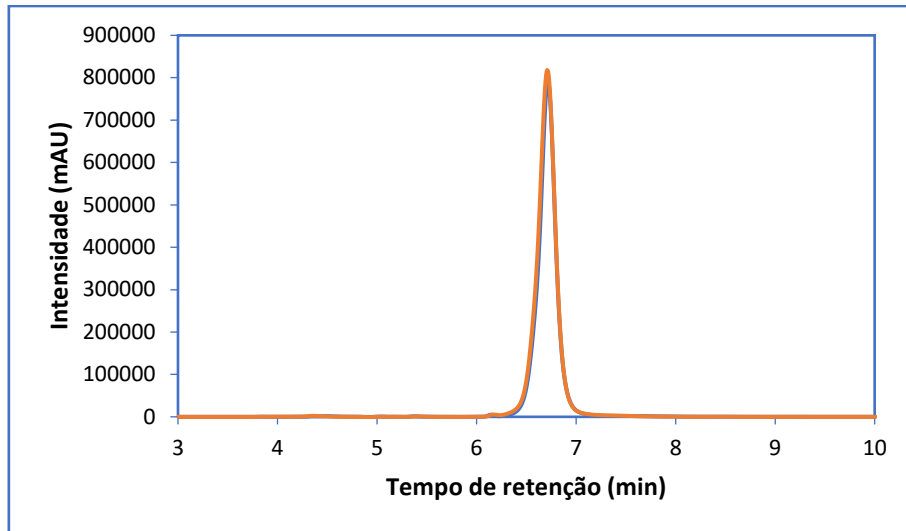


Figura 4-6: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a (—) 0 e (—) 30 dias.

Na Tabela 4-4, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração obtida a tempo zero, para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C.

Tabela 4-4: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
1,6°C	0	6,7	9494864	24,76	
	1	6,7	9482849	24,70	99,87
	6	6,7	9660074	25,67	101,74
	9	6,7	9384684	24,16	98,84
	28	6,7	10089625	28,04	106,26
	30	6,7	10189987	28,59	107,32

Como é possível verificar, Tabela 4-4 e Figura 4-7, durante o período estudado não houve qualquer variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C. A solução permaneceu quimicamente estável durante este intervalo de tempo, uma vez que todos os valores se encontram dentro do limite aceitável (90% - 110%) [27].

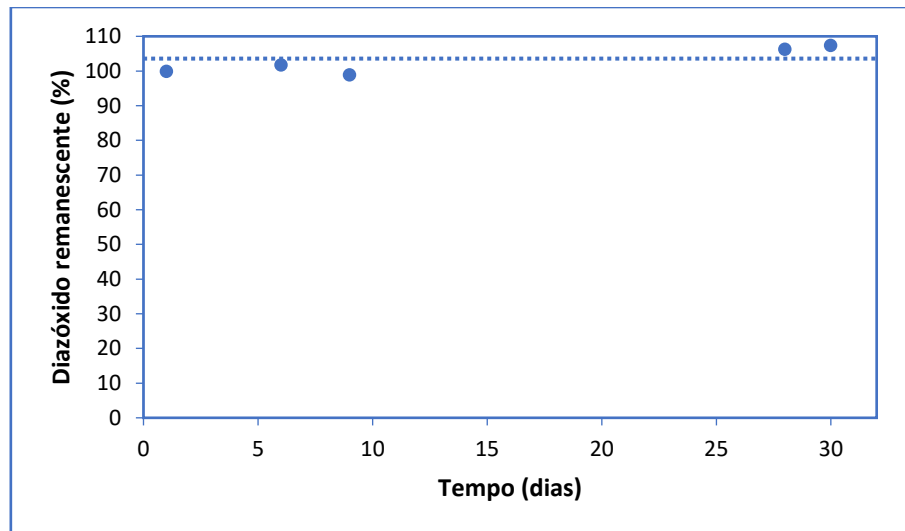


Figura 4-7: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra líquida armazenada no frigorífico a 1,6°C.

Na Figura 4-8, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$), a 0 e 30 dias.

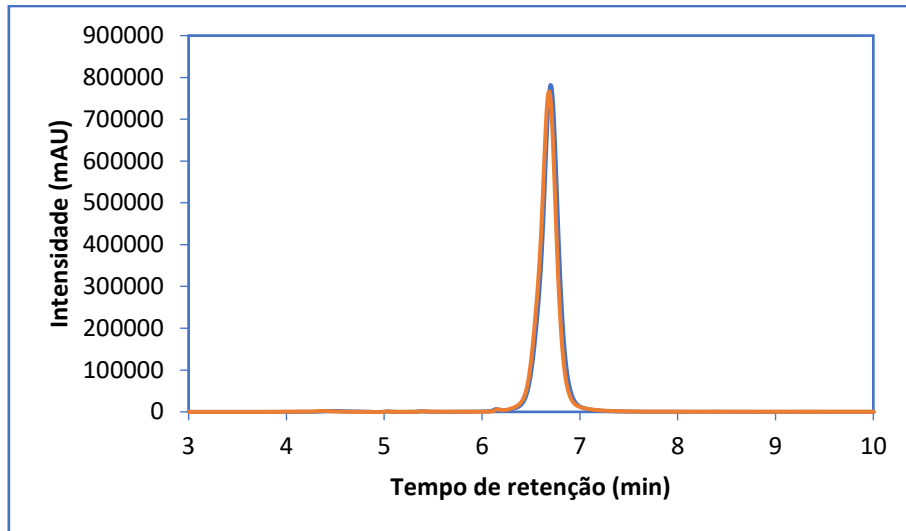


Figura 4-8: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$), a (—) 0 e (—) 30 dias.

Na Tabela 4-5, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração obtida a tempo zero, para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$).

Tabela 4-5: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$), a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
Temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$)	0	6,7	9466532	24,61	
	1	6,7	9220920	23,25	97,41
	6	6,7	9209868	23,19	97,29
	9	6,7	9471543	25,28	100,05
	28	6,7	9288393	23,63	98,12
	30	6,7	9269020	23,52	97,91

Como é possível verificar, Tabela 4-5 e Figura 4-9, durante o período estudado não houve qualquer variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$). A solução permaneceu quimicamente estável durante este intervalo de tempo, uma vez que todos os valores se encontram dentro do limite aceitável (90% - 110%) [27].

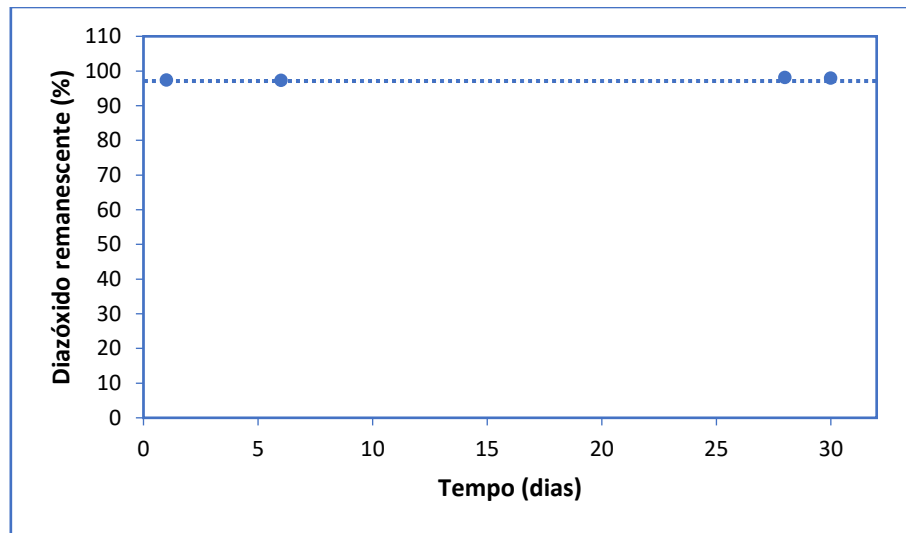


Figura 4-9: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra líquida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^{\circ}\text{C}$).

Na Figura 4-10, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C , a 0 e 9 dias.

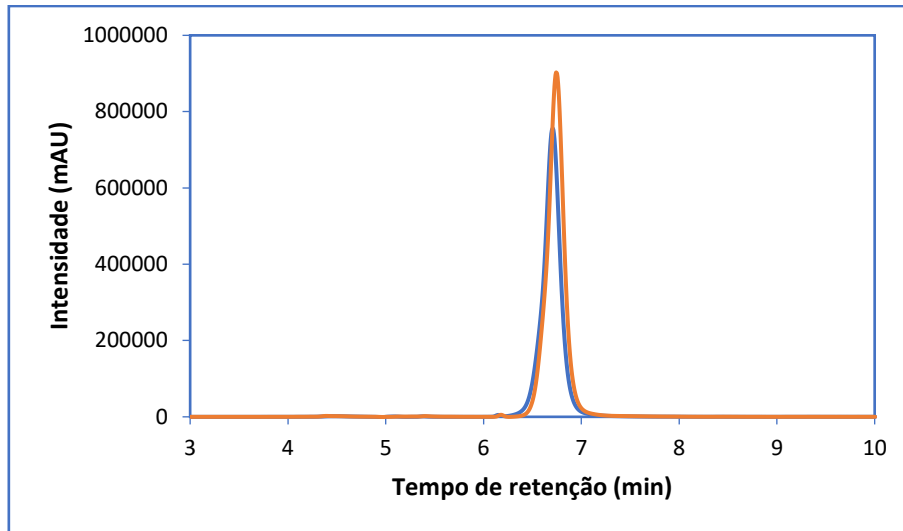


Figura 4-10: Cromatogramas obtidos para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C, a (—) 0 e (—) 9 dias.

Na Tabela 4-6, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração obtida a tempo zero, para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C.

Tabela 4-6: Concentrações e áreas obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C, a 0, 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
37°C	0	6,7	9338754	23,90	
	1	6,7	9253442	23,43	99,09
	6	6,7	10151108	28,38	108,70
	9	6,7	10864298	32,31	116,34

Como é possível verificar, Tabela 4-6, durante o período estudado houve uma variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra líquida armazenada na estufa a 37°C. A percentagem de diazóxido remanescente aumentou progressivamente ao longo de 9 dias. Este aumento pode ser justificado pelo facto de o frasco não ter sido rolhado convenientemente, de forma a prevenir a evaporação de solvente. De facto,

observou-se uma diminuição do volume total da amostra em resultado da evaporação do solvente ao longo do tempo de estudo.

Os estudos envolvendo a estabilidade térmica das amostras sólidas de diazóxido foram realizados de forma semelhante ao descrito para as amostras líquidas. Armazenaram-se três amostras de diazóxido em pó, em frascos de vidro transparente, durante 30 dias, a 1,6°C, à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e a 37°C. A tempos pré-definidos retirou-se uma alíquota, dissolveu-se no solvente apropriado e determinou-se a concentração de diazóxido usando a metodologia descrita anteriormente.

Na Figura 4-11, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 1 e 30 dias.

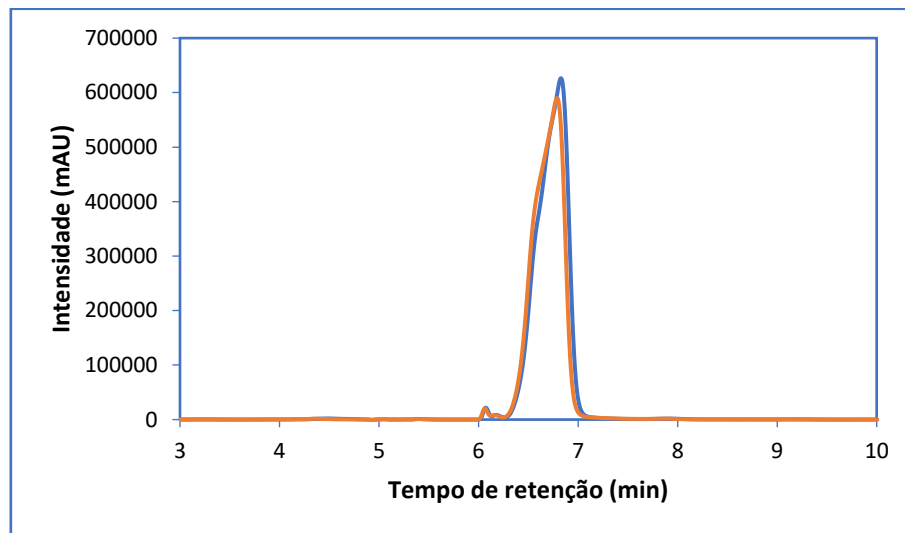


Figura 4-11: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a (—) 1 e (—) 30 dias.

Na Tabela 4-7, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração esperada, para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C.

Tabela 4-7: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C, a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
1,6°C	1	6,8	14088823	50,07	100,32
	6	6,8	12969173	43,90	91,33
	9	6,9	12402762	40,78	88,32
	28	6,8	12490376	41,27	89,61
	30	6,8	12836365	43,17	91,40

Como é possível verificar, Tabela 4-7 e Figura 4-12, durante o período estudado não houve qualquer variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C. A solução permaneceu quimicamente estável durante este intervalo de tempo, uma vez que os valores se encontram dentro do limite aceitável (90% - 110%) ou bastante próximos deste [27].

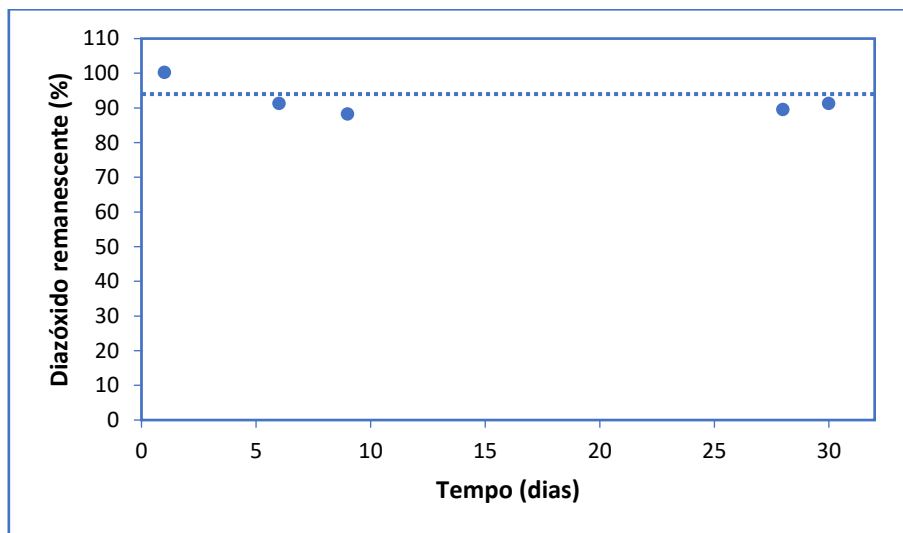


Figura 4-12: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada no frigorífico a 1,6°C.

Na Figura 4-13, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$), a 1 e 30 dias.

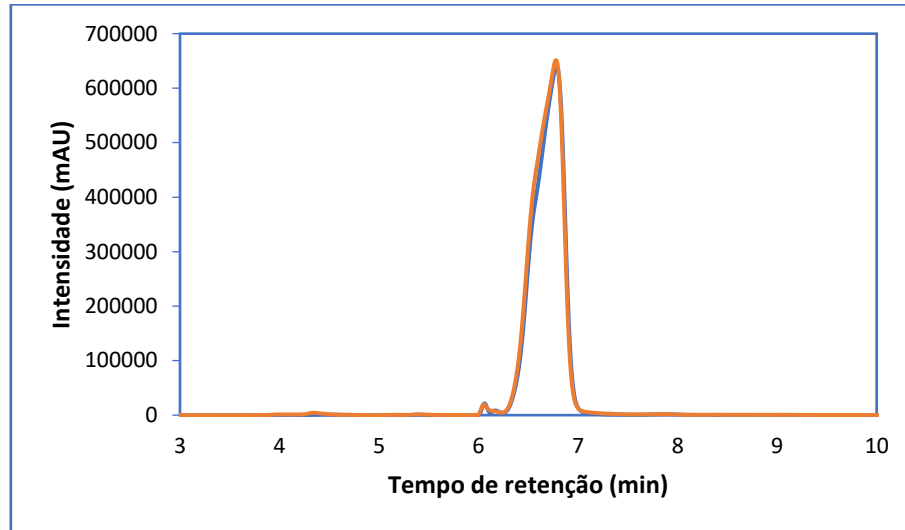


Figura 4-13: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$), a (—) 1 e (—) 30 dias.

Na Tabela 4-8, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração esperada, para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$).

Tabela 4-8: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$), a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
Temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$)	1	6,8	13046967	44,33	91,54
	6	6,8	12833668	43,16	91,73
	9	6,8	13470764	46,67	93,15
	28	6,8	12314542	40,30	88,68
	30	6,8	13559714	47,16	92,43

Como é possível verificar, Tabela 4-8 e Figura 4-14, durante o período estudado não houve qualquer variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$). A solução permaneceu quimicamente estável durante este intervalo de tempo, uma vez que os valores se encontram dentro do limite aceitável (90% - 110%) ou bastante próximos deste [27].

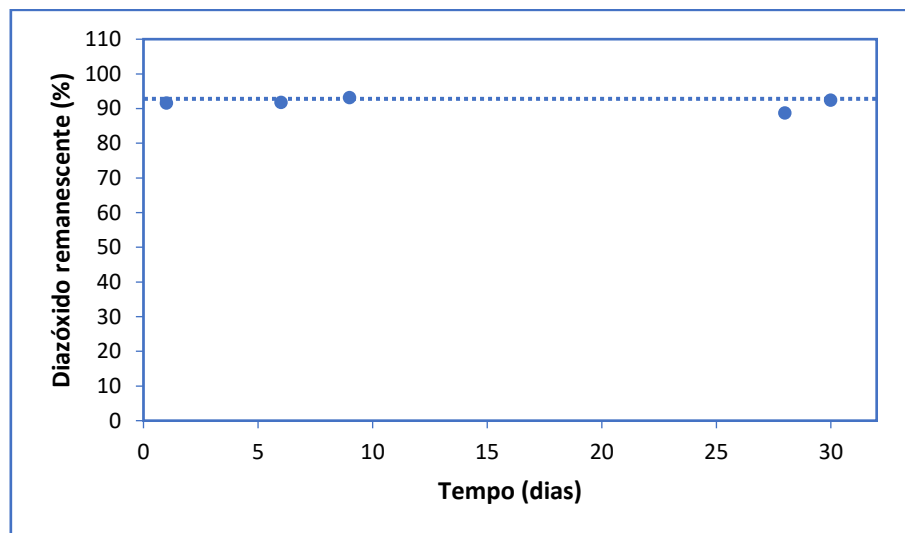


Figura 4-14: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$).

Na Figura 4-15, são apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C, a 1 e 30 dias.

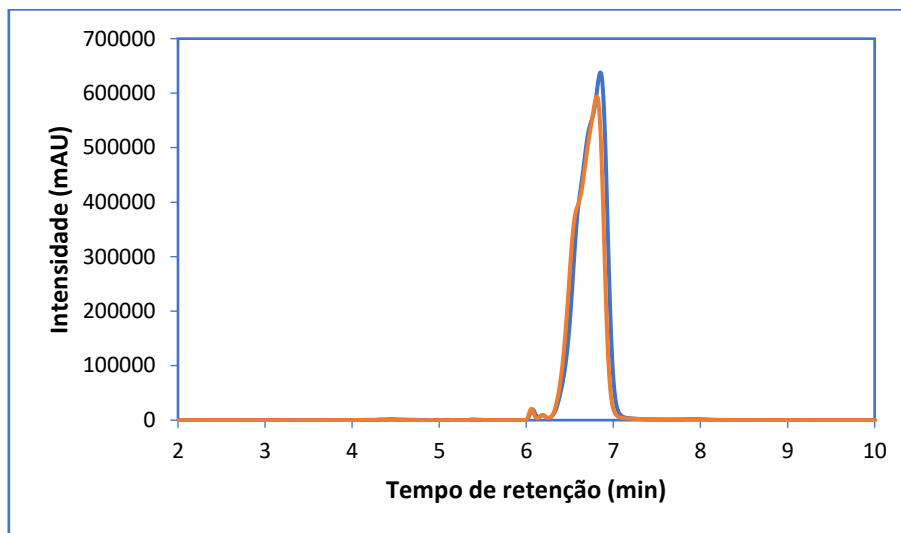


Figura 4-15: Cromatogramas obtidos para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C, a (—) 1 e (—) 30 dias.

Na Tabela 4-9, encontram-se os valores de concentração e área obtidos ao longo do estudo, assim como a percentagem de diazóxido remanescente comparativamente à concentração esperada, para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C.

Tabela 4-9: Concentrações e áreas esperadas e obtidas, assim como as percentagens de diazóxido remanescente, para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C, a 1, 6, 9, 28 e 30 dias (média obtida para 3 réplicas).

Condições	Tempo (dias)	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração obtida (mg/L)	% remanescente
37°C	1	6,8	13011680	44,14	93,00
	6	6,8	12734251	42,61	90,68
	9	7,0	14444649	52,03	100,24
	28	6,8	13387073	46,21	91,90
	30	6,8	12236274	39,87	87,46

Como é possível verificar, Tabela 4-9 e Figura 4-16, durante o período estudado não houve qualquer variação significativa da concentração de diazóxido para a amostra sólida armazenada no laboratório à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$). A solução permaneceu quimicamente estável durante este intervalo de tempo, uma vez que os valores se encontram dentro do limite aceitável (90% - 110%) ou bastante próximos deste [27].

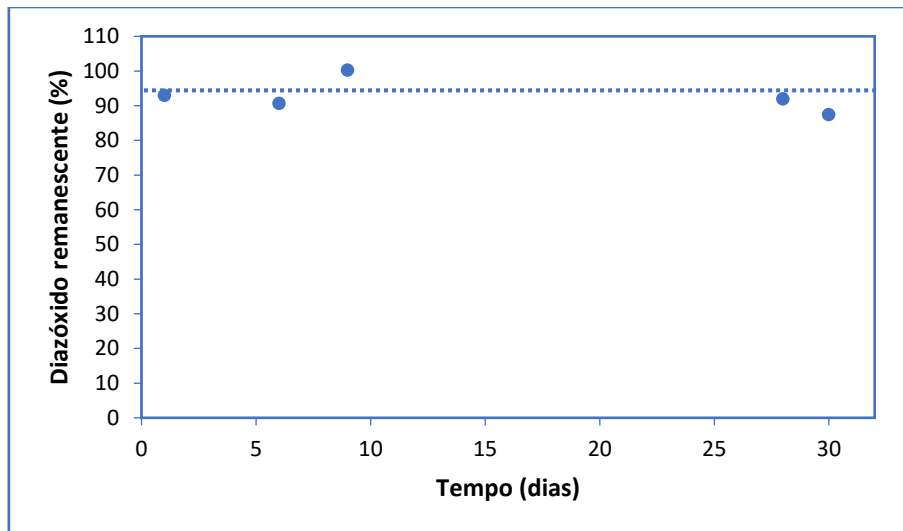


Figura 4-16: Percentagem de diazóxido remanescente (%) em função do tempo (dias) para a amostra sólida armazenada na estufa a 37°C .

4.3.2. Fotorreatividade

Para avaliar o potencial fotorreativo do diazóxido, inicialmente testou-se a sua propensão para absorver fótons em qualquer comprimento de onda entre 290 e 700 nm.

Foi preparada uma solução de diazóxido $10 \mu\text{g/mL}$ em DMSO e traçou-se o espectro de absorção na faixa de 290 a 700 nm, na qual o diazóxido exibiu absorção, que de acordo com a avaliação de fotosegurança S10 de produtos farmacêuticos é uma condição primária para considerar um produto químico para uma avaliação fototóxica. O espectro está representado na Figura 4-17 [36].

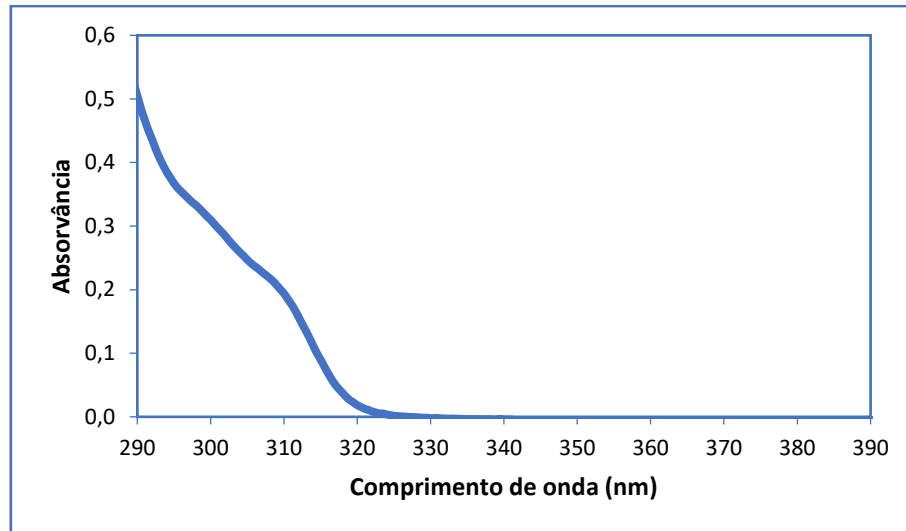


Figura 4-17: Espectro de absorção UV-Vis da solução de diazóxido 10 µg/mL preparada em DMSO.

Como a absorvância varia com a concentração e o percurso ótico, para o espectro foi medida a absorvância no comprimento de onda máximo para determinar a absorvidade molar (ϵ). A lei de Beer-Lambert, representada pela Equação 4-1 foi usada para calcular o valor de ϵ .

$$Abs = \epsilon \times c \times l \quad \text{(Equação 4-1)}$$

onde:

Abs – Absorvância;

ϵ – Absorvidade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$);

c – Concentração ($mol \cdot L^{-1}$);

l – Percurso ótico (cm).

Na tabela 4-10 está representado o valor de ϵ , o $\lambda_{\text{máx}}$ e a absorvância obtida usando o espectro de absorção do composto.

Tabela 4-10: Absortividade molar e comprimento de onda máximo da solução diazóxido de 10 µg/mL.

Composto	c (mol/L)	λ _{máx} (nm)	Abs	ε (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Diazóxido	4,42 × 10 ⁻⁵	290	0,5051	11423

Substâncias que não possuam uma absortividade molar superior a 1000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, em qualquer comprimento de onda entre 290 e 700 nm, não são consideradas suficientemente fotorreativas para resultar em fototoxicidade direta [37].

O diazóxido apresenta um ε superior a 1000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, o que significa que este é um possível composto digno de estudo em termos de fototoxicidade.

Para a realização de um ensaio de fotorreatividade, é necessário garantir condições de irradiação que satisfaçam os critérios recomendados usando um controlo positivo. Para garantir a seleção da condição adequada de exposição à luz UV-VIS, foi realizada uma otimização usando como controlo positivo, o quinino.

Neste ensaio, o SO foi determinado calculando a diminuição da absorvância de RNO a 440 nm, usando a Equação 4-2 [29]:

$$A_{440\text{ nm}} \times 1000 = [A_{440(-)} - A_{440(+)} - (a - b)] \times 1000 \quad (\text{Equação 4-2})$$

onde:

$A_{440(-)}$ - Absorvância a 440 nm antes da exposição à radiação;

$A_{440(+)}$ - Absorvância a 440 nm após a exposição à radiação;

a – Branco antes da exposição à radiação;

b – Branco após a exposição à radiação.

O SA foi determinado calculando o aumento da absorvância de NBT a 560 nm devido à formação de NBT+, usando a Equação 4-3 [29].

$$A_{560\text{ nm}} \times 1000 = [A_{560(+)} - A_{560(-)} - (b - a)] \times 1000 \quad (\text{Equação 4-3})$$

onde:

$A_{560(-)}$ - Absorvância a 560 nm antes da exposição à radiação;

$A_{560(+)}$ - Absorvância a 560 nm após a exposição à radiação;

a – Branco antes da exposição à radiação;

b – Branco após a exposição à radiação.

Para o controlo positivo do quinino, os valores de referência encontram-se mencionados na tabela 4-11.

Tabela 4-11: Valores de referência de SO e SA para o controlo positivo do quinino [29].

SO	319 a 583
SA	193 a 385

Quando exposto a 1h e 1h30min de irradiação, os valores obtidos para o SO foram 209 e 254, respetivamente, ficando abaixo da faixa aceitável deste protocolo, pelo que já não se realizou as leituras para o SA nestes intervalos de tempo.

Levando em consideração esses resultados, o tempo de exposição à irradiação foi aumentado para 2h, obtendo-se os valores de 396 e 195 para o SO e SA respetivamente. Apesar dos resultados obtidos se encontrarem dentro da gama dos valores de referência, o valor de SA está muito próximo do limite inferior. Sendo assim, decidiu-se aumentar o tempo de exposição à irradiação para 2h30min, de modo a se alcançar as condições ideais. Nestas condições, os resultados obtidos foram 449 e 259 para o SO e SA respetivamente, que estão dentro da faixa aceitável, confirmando que estes correspondem às condições ideais de teste.

Relativamente ao diazóxido, verificou-se que ambas as soluções de SO e SA sofreram alteração de cor após as 2h30min de exposição à radiação na câmara de climática a 25°C (Figuras 4-18 e 4-19).



Figura 4-18: Solução de SO antes e após a sua exposição à radiação.



Figura 4-19: Solução de SA antes e após a sua exposição à radiação.

Os resultados quantitativos relativos ao diazóxido encontram-se descritos na tabela 4-12.

Tabela 4-12: Valores de SO e SA obtidos para o diazóxido no ensaio da fotorreatividade.

SO	1484
SA	101

Com este ensaio foi possível concluir que o diazóxido é fotorreativo, gerando tanto SO quanto SA.

4.4. Complexos de inclusão com CDs

Para a caracterização dos complexos de inclusão com CDs começou-se por preparar complexos de inclusão com as ciclodextrinas HP- γ -CD e HP- β -CD, de seguida, realizaram-se os estudos de solubilidade em água desionizada e posteriormente analisou-se termicamente o complexo formado por *kneading* através do DSC.

4.4.1. Estudos de solubilidade em água desionizada

O diazóxido é praticamente insolúvel em água o que pode limitar a sua absorção e biodisponibilidade. O objetivo desta parte do estudo foi avaliar a possibilidade de preparar complexos de inclusão de diazóxido usando CDs, de forma a aumentar a solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade desta substância ativa. Os estudos de solubilidade em água desionizada foram realizados usando a HP- γ -CD e a HP- β -CD [32].

Para o ensaio de solubilidade em água desionizada prepararam-se matrizes contendo 30 mg de diazóxido e quantidades crescentes de cada uma das CDs. As soluções foram colocadas a agitar num agitador orbital, a 20°C e a 100 rpm, durante 96 horas. Durante este período recolheram-se alíquotas de cada um dos matrizes e determinou-se a concentração de diazóxido por espectrofotometria de UV-Vis. Em qualquer dos casos, observou-se que o equilíbrio era atingido ao final de 48h de agitação, uma vez que a partir deste tempo não se observaram variações significativas na concentração de cada uma das soluções.

Na Figura 4-20, encontram-se os espectros obtidos para o ensaio de solubilidade do diazóxido na presença de concentrações crescentes (0, 5, 10, 20 e 30 mM) de HP- γ -CD.

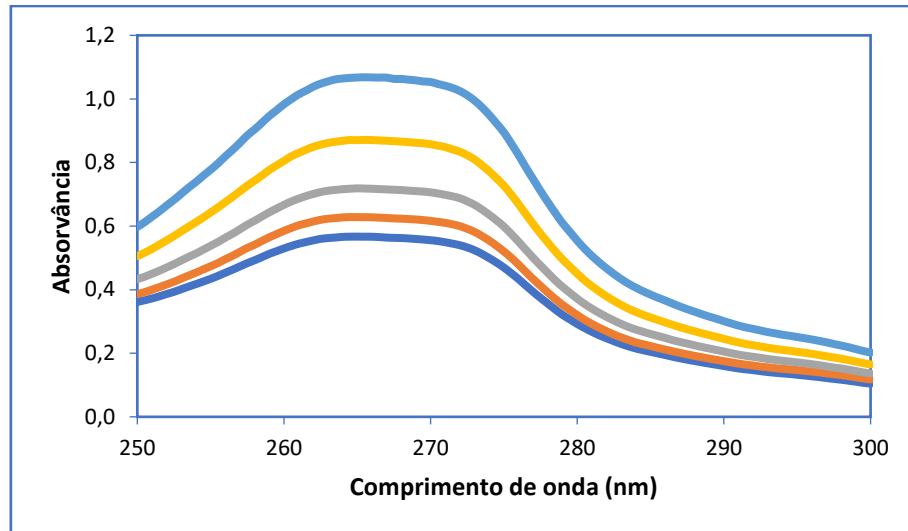


Figura 4-20: Espectros de UV-Vis das soluções de diazóxido em (—) 0 mM, (—) 5 mM, (—) 10 mM, (—) 20 mM e (—) 30 mM de HP- γ -CD preparadas em água desionizada.

A análise dos espectros e dos resultados obtidos permitiu concluir que a solubilidade do diazóxido aumenta com o crescimento da concentração de CDs (Tabelas 4-13 e 4-14).

Tabela 4-13: Absorvâncias e concentrações de diazóxido obtidas para as diferentes concentrações de HP- γ -CD em água desionizada à temperatura de 20°C, após 48 horas.

Ensaio	Solução	[HP- γ -CD] (mmol/L)	Abs a 266 nm	[Diazóxido] (mmol/L)
1	1	0,00	0,5668	0,10
	2	4,62	0,6283	0,12
	3	9,24	0,7187	0,15
	4	18,48	0,8711	0,20
	5	27,72	1,0681	0,26
2	1	0,00	0,5232	0,08
	2	4,62	0,6371	0,12
	3	9,24	0,7316	0,15
	4	18,48	0,8818	0,20
	5	27,72	1,0789	0,27
3	1	0,00	0,5096	0,08
	2	4,62	0,5981	0,11
	3	9,24	0,6772	0,13
	4	18,48	0,8517	0,19
	5	27,72	1,0421	0,25

Tabela 4-14: Absorvâncias e concentrações de diazóxido obtidas para as diferentes concentrações de HP- β -CD em água desionizada à temperatura de 20°C, após 48 horas.

Ensaio	Solução	[HP- β -CD] (mmol/L)	Abs a 266 nm	[Diazóxido] (mmol/L)
1	1	0,00	0,4612	0,06
	2	5,00	0,5755	0,10
	3	10,00	0,7057	0,14
	4	20,00	0,8688	0,20
	5	30,00	1,1314	0,28
2	1	0,00	0,5290	0,09
	2	5,00	0,6379	0,12
	3	10,00	0,7607	0,16
	4	20,00	0,9805	0,23
	5	30,00	1,2156	0,31
3	1	0,00	0,5130	0,08
	2	5,00	0,6180	0,12
	3	10,00	0,7466	0,16
	4	20,00	0,9693	0,23
	5	30,00	1,1950	0,30

Os diagramas de solubilidade foram obtidos representando graficamente, a concentração de diazóxido em função da concentração da HP- γ -CD (Figura 4-21) e HP- β -CD (Figura 4-22).

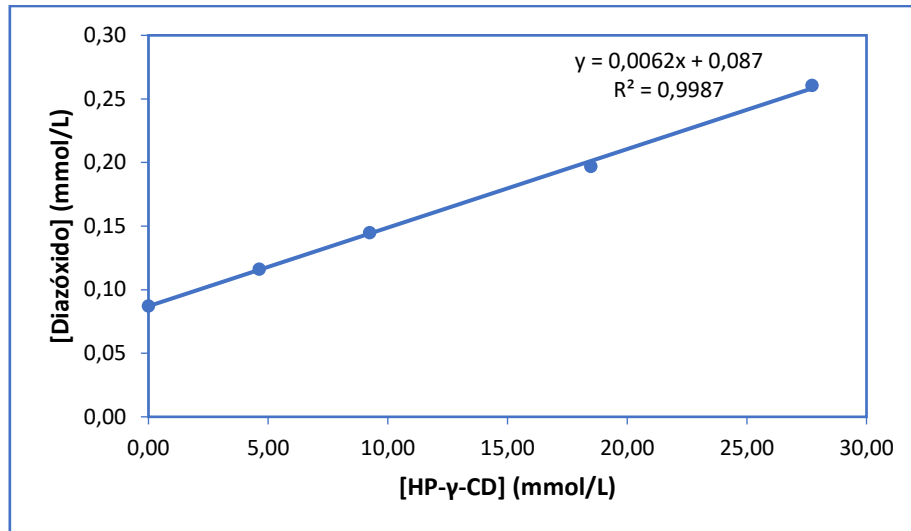


Figura 4-21: Diagrama de solubilidade do diazóxido em água desionizada na presença de HP-γ-CD.

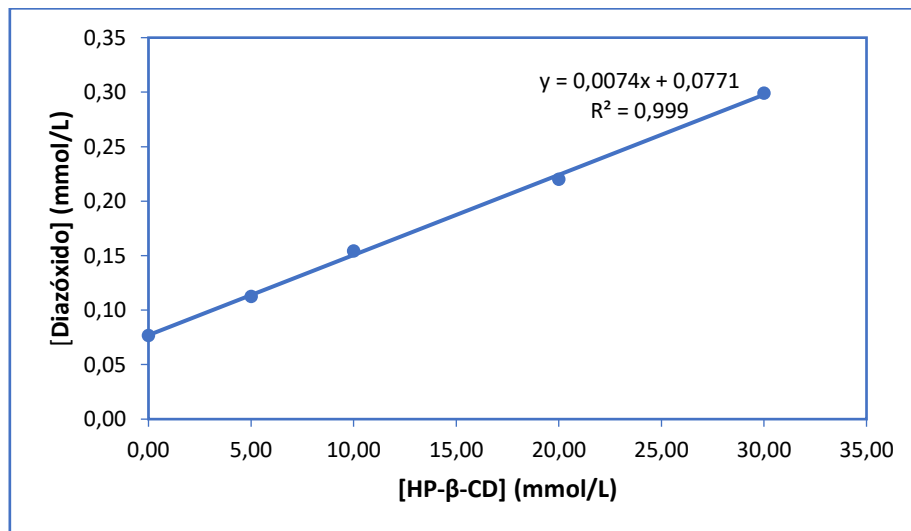


Figura 4-22: Diagrama de solubilidade do diazóxido em água desionizada na presença de HP-β-CD.

Em ambos os casos observa-se uma relação linear entre a concentração de diazóxido e a concentração da CD, e declives inferiores a 1, o que indicia que os complexos se formam na proporção 1:1 [32].

As constantes de estabilidade dos complexos formados com as CDs foram calculadas a partir da ordenada na origem (y_0) e do declive (m), dos diagramas de solubilidade, de acordo com a Equação 4-4.

$$K = \frac{m}{y_0 \times (1-m)} \quad (\text{Equação 4-4})$$

onde:

K – Constante de estabilidade do complexo formado;

m – Declive;

y₀ – Ordenada na origem.

Na Tabela 4-15 é possível verificar os valores médios de m, y₀ e K para as soluções preparadas com a HP- γ -CD e a HP- β -CD.

Tabela 4-15: Comparação dos dados obtidos para o cálculo da constante de estabilidade do diazóxido em HP- β -CD e HP- γ -CD.

Ciclodextrinas	Declive \pmDP	Ordenada na origem \pm DP (10^{-3} M)	K \pm DP (M^{-1})
HP- γ -CD	0,0062 \pm 0,0003	0,0870 \pm 0,0078	71,8 \pm 8,1
HP- β -CD	0,0074 \pm 0,0002	0,0771 \pm 0,0104	97,3 \pm 10,8

O valor médio obtido para as constantes de estabilidade dos complexos diazóxido/HP- γ -CD e diazóxido/HP- β -CD foram de 71,8 \pm 8,1 M⁻¹ e 97,3 \pm 10,8 M⁻¹, respetivamente.

Considerando os resultados obtidos pode-se concluir que a solubilidade do diazóxido aumenta 3 a 4 vezes com o aumento da concentração das CDs. Os complexos formados com ambas as CDs apresentam constantes de estabilidade semelhantes, pelo que aparentemente, o tamanho da cavidade da CD não tem influência no processo de encapsulação do diazóxido.

4.4.2. Preparação e caracterização do complexo diazóxido/HP- β -CD

O complexo de inclusão diazóxido/HP- β -CD foi preparado em estado sólido, por *kneading*, e em solução seguida de liofilização. Após a obtenção do complexo por *kneading*, o sólido foi seco num exsiccador sob vácuo durante 1 dia e analisou-se termicamente o complexo formado por DSC. Na Figura 4-23, encontram-se representadas as curvas DSC do diazóxido, HP- β -CD e do complexo de inclusão.

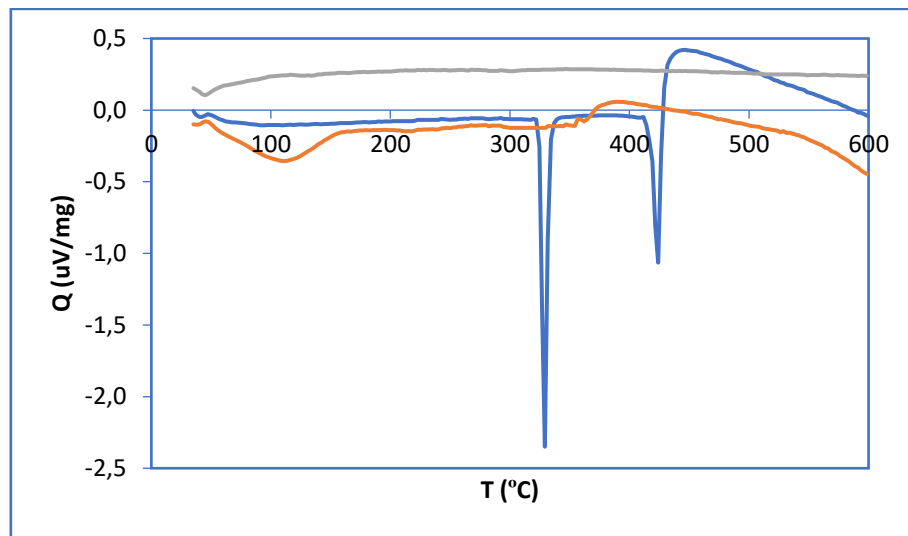


Figura 4-23: Curvas DSC obtidas para o (—) diazóxido, para a (—) HP- β -CD e para o (—) respectivo complexo de inclusão formado pelo método de *kneading*.

A curva DSC do diazóxido apresenta dois picos endotérmicos, a 329 °C e a 423 °C. Segundo a literatura, a temperatura de fusão do diazóxido é de 330,5 °C, enquanto que a ebulição ocorre a 414,8 °C. Assim, o primeiro pico observado no DSC é devido à fusão e o segundo à ebulição do diazóxido. Após este segundo pico, visualiza-se um aumento do fluxo de calor podendo indicar a decomposição deste composto [17].

A curva DSC da HP- β -CD, apresentou um pico endotérmico amplo, com seu máximo por volta dos 100 °C devido à evaporação de moléculas de água de cristalização da CD. Após os 400 °C verifica-se uma diminuição do calor, possivelmente relacionada com a decomposição térmica da própria HP- β -CD [37, 38].

A curva DSC do complexo de inclusão formado pelo método de *kneading* demonstrou o desaparecimento dos picos endotérmicos do fármaco e da HP- β -CD, pelo

que se pode concluir que o complexo sólido perdeu as propriedades cristalinas do fármaco, convertendo-o em amorfo, indicando assim a formação do complexo de inclusão diazóxido/HP- β -CD na proporção estequiométrica de 1:1 [37, 38].

Estes resultados sugerem que este sistema pode ser considerado como um verdadeiro complexo de inclusão. No entanto, serão necessários mais estudos usando outras técnicas analíticas de forma a caracterizar convenientemente o complexo de inclusão formado [35].

O complexo de inclusão preparado por liofilização não originou uma quantidade de sólido suficiente para caracterização posterior.

5. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da estabilidade físico-química de produtos farmacêuticos tendo em vista a definição do prazo de utilização de medicamentos manipulados disponibilizados em ambulatório, mais precisamente do fármaco hipotensor diazóxido.

A estabilidade físico-química do diazóxido foi avaliada através de ensaios de estabilidade térmica, a diferentes temperaturas, e de fotorreatividade. Nos ensaios de estabilidade térmica, amostras líquidas e sólidas foram colocadas à temperatura de 1,6°C, temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e 37°C durante 30 dias. Em intervalos de tempo predeterminados, avaliou-se a concentração de diazóxido presente nas amostras usando um método cromatográfico (HPLC). Os ensaios de fotorreatividade envolveram o estudo da absorvidade molar e ensaios de deteção de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS). Paralelamente, foi estudada a possibilidade de usar a encapsulação em ciclodextrinas como forma de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do diazóxido. Realizou-se um estudo de solubilidade com duas ciclodextrinas, HP- γ -CD e HP- β -CD, e determinaram-se as suas constantes de estabilidade.

Os estudos de estabilidade térmica permitiram verificar que o diazóxido permaneceu quimicamente estável, quando armazenado, tanto em solução como em estado sólido, a 1,6°C, à temperatura ambiente ($\approx 19^\circ\text{C}$) e a 37°C, durante o período em estudo.

A absorvidade molar do diazóxido a 290 nm foi de 11423 L.mol⁻¹.cm⁻¹, o que indica que esta substância é digna de estudo em termos de fototoxicidade. Realizaram-se ensaios de geração de ROS, obtendo-se os valores de 1484 e 101 para o SO e SA, respetivamente. Como os valores de SO e de SA são superiores a 70 e a 25, respetivamente, conclui-se que o diazóxido é fotorreativo.

Nos estudos de encapsulamento verificou-se, para ambas as CDs testadas, a existência de uma relação linear entre a solubilidade do diazóxido e a concentração das CDs, com declives inferiores a 1, o que indicia que os complexos se formam na proporção 1:1. O valor médio obtido para as constantes de estabilidade dos complexos diazóxido/HP- γ -CD e diazóxido/HP- β -CD foi de 71,8 \pm 8,1 M⁻¹ e 97,3 \pm 10,8 M⁻¹, respetivamente.

A análise por DSC do complexo de inclusão diazóxido/HP- β -CD, obtido pelo método de *kneading*, permitiu confirmar a formação deste complexo.

Como sugestão para trabalho futuro, considera-se que seria pertinente, no seguimento dos estudos efetuados, realizar uma caracterização mais aprofundada do complexo diazóxido/HP- β -CD, usando por exemplo a ressonância magnética nuclear (RMN), de forma a perceber como ocorre a inclusão da molécula dentro das CDs. Será igualmente conveniente repetir o ensaio de estabilidade térmica da amostra líquida a 37°C, usando um recipiente com tampa roscada, de forma a evitar a evaporação de solvente. Após estes estudos estarem concluídos, será necessário proceder à avaliação da estabilidade térmica e fotoquímica dos medicamentos manipulados de diazóxido disponibilizados em regime ambulatorio de farmácia hospitalar.

Bibliografia

- [1] A. R. Lopes de Carvalho, “Medicamentos manipulados para uso pediátrico,” Coimbra, Jun. 2015. Accessed: Jan. 15, 2022. [Online]. Available: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/79844/1/monografia_Andreia%20Carvalho_2015.pdf
- [2] INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso, “Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto,” Aug. 30, 2006. https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/035-E_DL_176_2006_9ALT.pdf/d2ae048e-547e-4c5c-873e-b41004b9027f (accessed Aug. 30, 2022).
- [3] L. V. Nogueira Prista, A. Correia Alves, and R. Morgado, *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, 4ª., vol. I. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- [4] C. Cabral and J. R. Pita, “Temas de Saúde, Farmácia e Sociedade,” 2015. Accessed: Jan. 15, 2022. [Online]. Available: https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/exposicoes/exposicoes_stemporarias/2exposicao.pdf
- [5] A. F. Guerra Pacheco, “Estudo da produção atual de medicamentos manipulados nos hospitais portugueses,” Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013. Accessed: Jan. 15, 2022. [Online]. Available: https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/4044/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_AFPacheco.pdf

- [6] R. Pombal, P. Barata, and R. Oliveira, “ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS MANIPULADOS,” vol. 7, pp. 330–341, Aug. 2010, Accessed: Mar. 01, 2022. [Online]. Available: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3007/3/330-341.pdf>
- [7] C. Maurício Barbosa, “Manipulação Clínica - Dispensa clínica de medicamentos manipulados,” *Boletim do Centro de Informação do Medicamento*, 2009. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/81239/2/103254.pdf> (accessed Mar. 02, 2022).
- [8] R. Lopes Marques, “Estabilidade dos Medicamentos Manipulados,” Sep. 2014. https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/80531/1/M_Rodrigo%20Marques.pdf (accessed Mar. 01, 2022).
- [9] V. L. Pereira Santos, “Estabilidade e tempo de vida útil de fármacos e medicamentos,” *Universidade Fernando Pessoa*, 2012. https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3755/3/PPG_VanessaSantos.pdf (accessed Apr. 29, 2022).
- [10] J. Niely de Souza, “Estudo de estabilidade: Fatores que influenciam na estabilidade do medicamento,” Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2014. Accessed: Sep. 01, 2022. [Online]. Available: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/11826/Julianenielydesouza.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- [11] *Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho - Aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar*. INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso, 2004. Accessed: Sep. 02, 2022. [Online]. Available: https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a
- [12] M. Ferreira Macedo, “Estudo da produção de manipulados nas farmácias comunitárias - Uma panorâmica actual,” Universidade da Beira Interior - Faculdade de Ciências da Saúde, Covilhã, 2012. Accessed: Apr. 29, 2022. [Online]. Available: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/1129/1/Dissertacao%20Final%20-%202012.pdf>
- [13] B. Mesmar, M. Kristan, M. Satyarengga, E. M. Lamos, R. Malek, and K. M. Munir, “The use of diazoxide in the management of spontaneous hypoglycemia in patients with ESRD,” *CEN Case Rep*, vol. 9, no. 3, pp. 271–277, Apr. 2020, doi: 10.1007/s13730-020-00471-z.
- [14] X. Chen, L. Feng, H. Yao, L. Yang, and Y. Qin, “Efficacy and safety of diazoxide for treating hyperinsulinemic hypoglycemia: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 16, no. 2, p. e0246463, Feb. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0246463.
- [15] L. A. Hastings, J. Preddy, M. McCready, K. Neville, and C. F. Verge, “Pericardial Effusion Associated with Diazoxide Treatment for Congenital Hyperinsulinism,” *Horm Res Paediatr*, vol. 93, no. 3, pp. 206–211, Jun. 2020, doi: 10.1159/000507624.

- [16] P. Thornton, L. Truong, C. Reynolds, T. Hamby, and J. Nedrelow, “Rate of Serious Adverse Events Associated with Diazoxide Treatment of Patients with Hyperinsulinism,” *Horm Res Paediatr*, vol. 91, no. 1, pp. 25–32, Mar. 2019, doi: 10.1159/000497458.
- [17] “Diazóxido - Informação Geral.”
<https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/diazoxido/informacao-geral>
(accessed May 13, 2022).
- [18] World Health Organization, *The Internation Pharmacopeia*, 6^a. 2016.
- [19] R. Gollakner, BS, DVM, and MPH, “Diazoxide | VCA Animal Hospital.”
<https://vcahospitals.com/know-your-pet/diazoxide> (accessed Sep. 09, 2022).
- [20] DrugBank, “Diazoxide,” Sep. 08, 2022. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01119>
(accessed Sep. 09, 2022).
- [21] ChEMBL, “Compound Report Card.”
https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL181/ (accessed Sep. 09, 2022).
- [22] “diazoxide.” <https://glowm.com/resources/glowm/cd/pages/drugs/d029.html>
(accessed May 13, 2022).

- [23] Â. S. Fernandes Mendes, “Sports Pharmacy: uma área potencial para o farmacêutico?,” Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2020. Accessed: Sep. 09, 2022. [Online]. Available: <https://eg.uc.pt/bitstream/10316/93096/1/Documento%20%C3%9Anico%20-%20%C3%82ngela%20Mendes.pdf>
- [24] A. F. Brandão da Silva, “Relatório de Estágio,” Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2014. Accessed: Sep. 04, 2022. [Online]. Available: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/85050/2/139003.pdf>
- [25] Infarmed, *Lista de medicamentos identificados pelo Infarmed – AUE de benefício clínico bem reconhecido*. 2022. Accessed: Sep. 04, 2022. [Online]. Available: www.infarmed.pt
- [26] B. Costa, “Terapêutica um fato à medida ou um fato ajustado?,” in *7^a semana APFH XVII Simpósio Nacional*, Nov. 2014. Accessed: Sep. 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.apfh.pt/xFiles/scEventManager/images/realizationResumeBook41.pdf>
- [27] M. Friciu, S. Zaraa, V. Gaëlle Roullin, and G. Leclair, “Stability of Diazoxide in Extemporaneously Compounded Oral Suspensions,” *PLOS/ONE*, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0164577.
- [28] OECD, “Test No. 495: ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity,” in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Paris, France: OECD, 2019. doi: 10.1787/915E00AC-EN.

- [29] “REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS Issued by: ROS assay Validation Management Team,” May 2013, Accessed: Jul. 27, 2022. [Online]. Available: https://www.jacvam.jp/files/list/03/03_02_E1.pdf
- [30] A. C. Lopes Simões Teixeira, “Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução.”, Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2012. Accessed: Mar. 24, 2022. [Online]. Available: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3573/6/T_11657.pdf
- [31] R. Oliveira, D. Santos, and P. Coelho, “CICLODEXTRINAS: FORMAÇÃO DE COMPLEXOS E SUA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA,” *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, pp. 70–83, 2009, Accessed: Mar. 24, 2022. [Online]. Available: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/1271/2/70-83_FCS_06_-15.pdf
- [32] T. Higuchi and K. A. Connors, “Phase Solubility Techniques,” *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*, vol. 4, pp. 117–212, 1965.
- [33] E. M. P. J. Garrido, A. S. Cerqueira, D. Chavarria, T. Silva, F. Borges, and J. M. P. J. Garrido, “Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl- β -cyclodextrin,” *Food Chem*, vol. 254, pp. 260–265, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.007.
- [34] T. Martins, “Desenvolvimento, caracterização e avaliação da formação de complexos de inclusão de rutina, avobenzona e p-metoxicinamato de ocila na presença de ciclodextrinas,” Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Accessed: Sep. 07, 2022. [Online]. Available: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-05092018-104724/publico/Tercio_Elyan_Azevedo_Martins_DO_Original.pdf

- [35] A. M. Ribeiro, “Preparação, caracterização e aplicação de complexos de inclusão de Miconazol com Metil - β - ciclodextrina: administração bucal,” Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2008. Accessed: Sep. 07, 2022. [Online]. Available: <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/7375>
- [36] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), “S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals Guidance for Industry,” Jan. 2015. Accessed: Sep. 09, 2022. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/media/85076/download>
- [37] T. Bal, S. Sengupta, and P. N. Murthy, “Formulation and evaluation of carvedilol microcapsules using Eudragit NE30D and sodium alginate,” *Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, no. 4, 2013, Accessed: Sep. 09, 2022. [Online]. Available: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/Tw3GcwwS3cZVmfWrPTsXYNf/?format=pdf&lang=en>
- [38] J. S. Kim, “Study of Flavonoid/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes by UV-Vis, FT-IR, DSC, and X-Ray Diffraction Analysis,” *Prev Nutr Food Sci*, vol. 25, no. 4, p. 449, Dec. 2020, doi: 10.3746/PNF.2020.25.4.449.