

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de complexos tamoxifeno- β -
ciclodextrina

Cibele Nabhan Benetti

Campo Grande

2014

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de complexos tamoxifeno- β -
ciclodextrina

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul como
requisito final para obtenção do
título de Mestre em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Patrik Oening Rodrigues

Dedico essa dissertação...

Aos meus pais, José Hélio Benetti e Syrlene Maria Nabhan Benetti, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e da Fé.

Agradecimentos

- ✓ Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, sabedoria, inteligência e me proporcionar paz interior.
- ✓ À minha família por me apoiar em todas as minhas decisões e estar presente em todos os momentos de minha vida.
- ✓ Ao prof. Dr. Patrik Oening Rodrigues agradeço pela orientação e pelo fato de acreditar em mim ao me deixar desenvolver um trabalho tão trabalhoso como foi este.
- ✓ À prof. Dr. Nájla Mohamed Kassab, pelo apoio nos experimentos utilizando a cromatografia.
- ✓ À prof. Dr. Aline Carollo, pela colaboração nos experimentos iniciais do trabalho.
- ✓ Ao prof. Msc. Teófilo Fernando Mazon Cardoso, pelo apoio e motivação no laboratório de pesquisa.
- ✓ Ao prof. Msc. Lothar Peters um agradecimento mais que especial, onde mesmo aposentado foi ao laboratório me ajudar vários dias com a produção dos comprimidos.
- ✓ Ao prof. Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira do instituto de química da UFMS, por ceder o equipamento de análise térmica e o de microscopia eletrônica de varredura.
- ✓ Ao prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira do instituto de física da UFMS, por proporcionar as medidas no infravermelho.
- ✓ Ao professor Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares, que realizou a microscopia óptica.
- ✓ Aos técnicos do laboratório de tecnologia farmacêutica: Vanderlei, Charles e Patrícia (agora professora da UFMS) pela ótima convivência de 4 anos e meio no laboratório

- ✓ Ao técnico do laboratório de farmacologia, o Walter, pela grande ajuda no biotério.
- ✓ Ao técnico da microscopia eletrônica de varredura, o Luiz Felipe por realizar as fotos.
- ✓ Ao técnico de laboratório do DTA, o Marcio, por me ajudar na liofilização.
- ✓ Às minhas colegas de laboratório e de faculdade que se tornaram grandes amigas, Rúbia e Melisha. Agradeço pelo companheirismo de todos os dias, dos almoços no LTF, dos desabafos quando nada dava certo, por todo carinho e amizade de vocês.
- ✓ À minha aluna de iniciação científica Ana Carla Lucca que mesmo sem bolsa continuou a me ajudar com experimentação dos animais.
- ✓ Ao Amador Alves Bonifácio Neto pelo companheirismo e carinho.
- ✓ Aos meus amigos agradeço pela amizade, apoio e companheirismo em todos os momentos.

Muito Obrigada!!!!!!

*É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se em ver a vida passar
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...”*

Martin Luther King

Resumo

O Tamoxifeno (TAM) pertence à classe II na classificação biofarmacêutica possuindo baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade nas membranas plasmáticas. Fármacos com características de pouca solubilidade em água constitui ótima alternativa para formação de complexos de inclusão com a β -ciclodextrinas (β CD), no intuito de melhorar a solubilidade aquosa dessas substâncias. A ciclodextrinas apresentam grupos hidroxilas que a tornam relativamente hidrofílica, e uma cavidade hidrofóbica que possibilita a formação de complexos de inclusão com vários tipos de moléculas alterando suas propriedades físico-químicas, o que resulta também em sistemas com maior adaptabilidade à inclusão em polímeros matriciais para liberação prolongada. Com o intuito de melhorar as propriedades físico-químicas do tamoxifeno, esse trabalho tem por objetivo desenvolver e avaliar as características físico-químicas e o perfil de liberação *in vitro* de complexos tamoxifeno- β -ciclodextrina produzidos por diferentes metodologias. Os complexos foram preparados na melhor razão molar com base no estudo de solubilidade de fases. A metodologia empregada para realização desses complexos foi pelo método da pasta, fusão, coevaporação e liofilização. Os complexos formados foram avaliados por análise térmica, espectroscopia do infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e tiveram sua solubilidade avaliada. Foram preparados comprimidos de liberação prolongada de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e polioxietileno (PEO) para todos os complexos formados e para o fármaco puro, os quais foram avaliados quanto a sua dissolução *in vitro* por modelos estatísticos apropriados. Os resultados obtidos no estudo de solubilidade de fases demonstraram que a melhor razão molar foi a de 1:1, onde apenas uma molécula de β -ciclodextrina foi necessária para complexação. As análises de calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e de MEV demonstram que houve diferenças térmicas e morfológicas dos complexos em relação ao fármaco puro, principalmente nos métodos da fusão, liofilização e coevaporação, indicando que houve formação de complexos. O método de IV confirmou os resultados da análise térmica e sugeriu a inclusão do anel aromático na cavidade da β -CD. A solubilidade de todos os complexos mostrou-se superior à do fármaco o que sugere à formação de complexos de inclusão. De forma geral, a incorporação do fármaco complexado na matriz polimérica demonstrou extensão na liberação do fármaco, sendo mais eficaz nas primeiras horas de dissolução, devido aos mecanismos de difusão do fármaco na matriz proporcionado pela complexação com a β CD. Os comprimidos desenvolvidos tiveram sua qualidade avaliada, o que demonstrou falha na formulação de HPMC com o complexo de liofilização devido à alta porosidade dos constituintes da formulação. A validação do método demonstrou-se eficaz na determinação de tamoxifeno e ainda constitui-se de um teste rápido e com baixo custo de solventes.

Palavras-chave: Citrato de tamoxifeno, β -ciclodextrina, liberação prolongada, Dissolução, polímeros hidrofílicos.

Abstract

Tamoxifen (TAM) is a class II drug as per the Biopharmaceutical Classification System. TAM has low solubility in aqueous solutions and easily permeates the plasma membrane. Because TAM has low solubility in aqueous solutions, the formation of inclusion complexes with β -cyclodextrin (β -CD) is an excellent strategy to improve its solubility these substance. Cyclodextrins has hydroxyl groups that make it relatively hydrophilic and a hydrophobic cavity that allows the formation of inclusion complexes with various types of molecules. These complexes alter the physical and chemical properties of the engulfed molecules, thus allowing for the creation of systems that are easily included in matrix polymers for sustained release. The aim of the present study was to evaluate and improve the physical and chemical properties, as well as the *in vitro* release profile, of TAM- β -CD complexes formed by different methods. The complexes were prepared at the optimal molar ratio as determined by a phase solubility study by kneading, melting, coevaporation, and freeze-drying. The TAM- β -CD complexes were evaluated by thermal analysis, infrared spectroscopy (IR), and scanning electron microscopy (SEM); in addition, their solubility was assessed. Sustained-release tablets of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and polyoxyethylene (PEO) were prepared for each of the complex types and for the pure drug, after which the *in vitro* dissolution of the tablets was assessed. The results obtained in the phase solubility study demonstrated that the best molar ratio was 1:1, in which only 1 molecule of β -cyclodextrin was necessary for complexation. Differential scanning calorimetry, thermogravimetry, and SEM showed that there were thermal and morphological differences between the complexes and the pure drug, especially when the melting, freeze-dry, and coevaporation methods were used, which confirmed that complexes were formed. IR spectroscopy confirmed the results of the thermal analysis and suggested the inclusion of the aromatic ring in the cavity of β -CD. The solubility of all the complex types was greater than that of the pure drug. In general, the incorporation of the complexed drug in the polymeric matrix resulted in extended release of the drug, which was more effective in the first hours of dissolution, due to the diffusion of the complexed drug, which was facilitated by β -CD. Quality assessments of the tablets showed that the HPMC formulation formed by freeze-drying failed because of the high porosity of the formulation components. The validation of the method demonstrated that it is effective in the determination of tamoxifen and that it is a rapid test that uses low-cost solvents.

Keywords: Citrate tamoxifen. β -cyclodextrin, Drug delivery, Dissolution test, hydrophilic polymers.

Sumário

Introdução Geral e Objetivos	1
Revisão de Literatura.....	9
1.1- Revisão Geral sobre o câncer de mama.....	10
1.2- Considerações gerais sobre o tamoxifeno	11
1.3- Ciclodextrinas.....	14
1.4- Formas farmacêuticas de liberação prolongada	20
1.5- Matrizes hidrofílicas	23
Referências Bibliográficas.....	28
Publicação científica.....	39
Anexos.....	70
Anexo I- Determinação do teor dos complexos tamoxifeno- β -ciclodextrina.....	71
Anexo II- Avaliação das características físicas dos comprimidos Anexo III.....	72
Anexo III- Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de TAMOX nos comprimidos.....	75
Anexo IV- Determinação do teor de TAMOX nos comprimidos de liberação prolongada.....	82
Anexo VI- Microscopia Óptica dos diferentes complexos desenvolvidos e do fármaco puro.....	83
Referências bibliográficas.....	85
Discussão Geral.....	86
Conclusões.....	89

Introdução Geral

e

Objetivos

INTRODUÇÃO GERAL

O Tamoxifeno (TAM) é um modulador seletivo de receptor de estrogênio que atualmente é utilizado como um agente terapêutico endócrino. Usado amplamente para todas as fases do câncer de mama, devido à inibição completa da ligação do estradiol com o receptor de alta afinidade de estrogênio e, desta forma impedindo a proliferação de células tumorais (ZHU et al., 2008; JORDAN et al., 2007).

TAM é empregado na terapêutica para as seguintes situações: tratamento do câncer de mama, redução do risco de câncer de mama, carcinoma de ducto e ginecomastia (MENDES, 2002). Possui baixa solubilidade em água o que dificulta sua absorção e consequentemente sua biodisponibilidade. Fármacos com essa característica, tem despertado o interesse de pesquisadores na utilização de alternativas tecnológicas que melhorem a performance de solubilidade e consequente absorção. Nesse sentido as ciclodextrinas (CDs), em seus mais variados tipos de apresentação, constituem alternativa de indubitável interesse e potencial.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos cristalinos, formados por seis, sete ou oito unidades de D-glucopirranose, que se apresentam na forma de um anel cilíndrico. Possuem grupos hidroxilas voltados para o exterior da molécula, que a tornam relativamente hidrofílica e possibilitam sua dissolução em meio aquoso; e uma cavidade hidrofóbica formada por cadeias de carbono e pelo anel de dois átomos de oxigênio incluídos nas ligações glicosídicas. Esta cavidade possibilita a formação de complexos de inclusão com vários tipos de moléculas (VAN SANTVLIET et al., 1998; FERNANDES e VEIGA, 1999; SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002; MANZOORI, ZADEH e AMJADI, 2005; SHEN et al., 2005; GAZPIO et al., 2005, ZHANG et al., 2009).

A formação de complexos com CDs altera as propriedades físico-químicas das moléculas, incluindo a solubilidade, ponto de fusão, volatilidade, sublimação e reatividade química. As propriedades espectroscópicas e eletroquímicas, a morfologia e a cristalinidade, bem como a estabilidade frente a processos de degradação dos complexos também apresentam-se diferentes em relação à molécula em sua forma livre (MONTASSIER, DUCHÊNE e

POELMAN, 1997; FICARRA et al., 2000; WONG e YUEN, 2001; SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002; LI et al., 2005; LIU e ZHU, 2005). Além disso, a complexação pode possibilitar um isolamento físico de compostos incompatíveis e modificar a liberação de fármacos a partir de diferentes sistemas poliméricos (BIBBY, DAVIES e TUCKER, 2000), incluindo matrizes hidrofílicas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (SAMMY e SAFWAT, 1994; SANGALLI et al., 2001; RAO, HASLAM e STELLA, 2001) e Polioxetileno (PEO) (AMIEL e SEBILLE, 1996; HUANG, ALLEN e TONELLI, 1998). Todavia, sistemas de liberação prolongada normalmente constituem alternativa tecnológica para veiculação de fármacos com melhores características de solubilidade, o que não é o caso do fármaco em questão.

Dentre as ciclodextrinas existentes, a β -ciclodextrina (β CD) tem sido a mais comumente utilizada como agente complexante, devido ao fato de seu anel apresentar as dimensões mais propícias para a maioria das moléculas de fármacos (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE, 1998; SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002; ASHFORD, 2005).

Atualmente no mercado nacional, as formas farmacêuticas sólidas que contêm o tamoxifeno apresentam-se como um modelo de liberação imediata o que resulta em desconforto posológico, pois a administração deve ser feita de duas a quatro vezes ao dia para que se mantenha o nível plasmático satisfatório do fármaco. Além desse fator, vale lembrar que o tratamento normalmente é longo (2 meses a 5 anos) exigindo muita persistência dos pacientes.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada tem sido amplamente investigado, com vistas ao alcance do prolongamento do tempo de ação farmacológica de substâncias ativas. A extensão da liberação tem se mostrado vantajosa na medida em que aumenta a adesão do pacientes ao tratamento, em especial quando a administração de diversas doses ao dia é necessária (KOESTER, 2003).

Nesse sentido, a utilização de técnicas de complexação do Tamoxifeno com a β -ciclodextrina tende a resultar em produtos com melhores características de solubilidade e consequente absorção, resultando também em

sistemas com maior adaptabilidade à inclusão em polímeros matriciais para liberação prolongada, culminando em melhora na eficácia terapêutica do paciente.

Dessa forma, o desenvolvimento do presente trabalho justifica-se no desenvolvimento de uma nova formulação do TAM, utilizando a β CD para que se encontrem melhorias na solubilidade do fármaco, confirmadas por testes *in vitro*, diminuindo assim os efeitos colaterais pelo excesso de dose do fármaco nos tecidos.

Assim sendo, os objetivos do presente trabalho englobam:

OBJETIVO GERAL:

Desenvolver e avaliar as características físico-químicas e o perfil de liberação *in vitro* de complexos tamoxifeno- β -ciclodextrina produzidos por diferentes metodologias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar a capacidade de complexação entre o fármaco em estudo e a β -ciclodextrina, e a influência da formação de complexos sobre a solubilidade do fármaco;
- Preparar complexos sólidos de tamoxifeno com β -ciclodextrina utilizando os métodos da pasta (*kneading*), coevaporação, liofilização e fusão, avaliando a eficiência de cada método de complexação utilizado;
- Investigar a influência da complexação sobre as características físico-químicas do tamoxifeno, incluindo solubilidade, características termodinâmicas, espectroscópicas e de estabilidade;
- Preparar comprimidos matriciais de hidroxipropilmetilcelulose e polioxietileno contendo os complexos, avaliando a liberação *in vitro* do fármaco a partir de comprimidos matriciais, bem como os mecanismos envolvidos nesta liberação, por meio de modelos matemáticos e estatísticos apropriados.

Referências Bibliográficas

AMIEL, C.; SEBILLE, B. New associating polymer systems involving water soluble β -cyclodextrin polymers. **J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.** v. 25, p. 61-67, 1996.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2.ed. São Paulo: Artmed, p. 245-263, 2005.

BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**.v. 197, p. 1-11, 2000.

FERNANDES, F.M; VEIGA, F.J.B. **As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica**. I Produção, estrutura e propriedades. Revista de Ciências Farmacêuticas. v. 20 n. 2, p. 335-351, 1999.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; BELLA, M.R.D.; RANERI, D.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M.L.; VILLARI, A; COPPOLINO, S. Study of the inclusion complex of atenolol with β -ciclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 23, p. 231-236, 2000.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; ZUBIRI, I.X.G.; VÉLAZ, I.; OHÁRRIZ, C.M.; MARTIN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol an cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, p. 487-492, 2005.

GAZZANIGA, A. Influence of betacyclodextrin on the release of poorly soluble drugs from inert and hydrophilic heterogeneous polymeric matrices. **Biomaterials**. v.22, p. 2647-2651, 2001.

HUANG, L.; ALLEN, E.; TONELLI, A.E. Study of the inclusion compounds formed between α -cyclodextrin and high molecular weight poly (ethylene oxide) and poly (ϵ -caprolactone). **Polymer**, v.39, n.20, 1998.

JORDAN, V.C. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. **Steroids**. v. 72, p. 829-842, 2007.

KOESTER, L.S.; XAVIER, C.R.; MAYORGA, P.; BASSANI, V.L. Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 55, p.85-91, 2003.

LI, N.; ZHANG, Y.H.; XIONG, X.L.; LI, Z.G.; JIN, X.H.; WU, Y.N. Study of the physicochemical properties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 38, p. 370-374, 2005.

LIU, L.; ZHU, S. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2005.

MANZOORI, J.L.; ZADEH, H.A.; AMJADI, M. Study on the complex between B-cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application. **II Farmaco**. v. 60, p. 575-581, 2005.

MENDES, F. V. L. Tamoxifeno. In: BERMUDEZ, J. A. Z. **Fundamentos Farmacológicos Clínicos dos Medicamentos de uso corrente**. Rio de Janeiro: ENSP, 2002.

MONTASSIER, P.; DUCHÊNE, D.; POELMAN, M.C. Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 153, p. 199-209, 1997.

RAO, V.M.; HASLAM, J.L.; STELLA, V.J. Controlled and complete release of a model poorly water-soluble drug, prednisolone, from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets using (SBE)7M- β -cyclodextrin as a solubilizing agent. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 90, n. 7, p. 807-816, 2001.

SAMMY, E.M.; SAFWAT, S.M. In vitro release of anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrin from hydrophilic gel bases. **STP Pharma. Sci.**v. 4, p. 458-465, 1994.

SANGALLI, M.E.; ZEMA, L.; MARONI, A.; FOPPOLI, A.; GIORDANO, F.; GAZZANIGA, A. Influence of betacyclodextrin on the release of poorly soluble

drugs from inert and hydrophilic heterogeneous polymeric matrices. **Biomaterials**, v.22, p. 2647-2651, 2001.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. **Biotechnological applications of cyclodextrins**. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 341-359, 2002.

SHEN, Y.L.; YANG, S.H.; WU, L.M.; MA, X.Y. Study on structure and characterization of inclusion complex of gossypol/beta cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 61, p. 1025-1028, 2005.

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

VAN SANTVLIET, L.; CALJON, K.; PIETERS, L.; LUDWIG, A. Physicochemical properties, NMR spectroscopy and tolerance of inclusion complexes of antazoline and tetracaine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 171, p. 147-156, 1998.

WONG, J.W.; YUEN, K.H. Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β and γ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 227, p. 177-185, 2001.

ZHANG, M.; LI, J.; ZHANG, L.; CHAO, J. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 71, p. 1891-1895, 2009.

ZHU, Y.B.; ZHANG, Q.; ZOU, J.J.; YU, C.X.; XIAO, D.W. Optimizing high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for quantification of tamoxifen and two metabolites in human plasma: Application to a clinical study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 46, p. 349-355, 2008.

Revisão de Literatura

Inicia-se com uma breve introdução acerca do câncer de mama e da terapia medicamentosa anticâncer principalmente no uso do tamoxifeno. Em seguida, traz uma abordagem sobre as ciclodextrinas, os diferentes sistemas de liberação de drogas finalizando com os polímeros hidrofílicos.

1-1 Revisão geral sobre o câncer de mama

O câncer de mama é caracterizado como a principal causa de morte por câncer em mulheres e é classificado como o segundo tipo de carcinoma mais comum no mundo (SIEGEL, NAISHADHAM e JEMAL, 2012).

Segundo estudos, verificou-se que houve um aumento na prevalência do câncer de mama nos últimos anos devido à melhora na detecção e nos avanços no diagnóstico dessa doença (YANG et al, 2013). Ainda assim, Com base em estatísticas entre 1975 e 2009, os relatórios do Instituto Nacional do Câncer apontaram que mulheres nascidas atualmente, possuem 12 % de chance de desenvolver o câncer de mama, o que justifica uma melhora na terapia dessa doença (HOWLADER et al.,2012).

O câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada por tipos patológicos distintos. Os tumores de mama podem ser classificados em subgrupos de acordo com seu perfil de expressão molecular. Além disso, tumores de mama têm diversas mutações genéticas que afetam uma variedade de vias de sinalização. Isto leva muitas vezes a falta de resposta ou resistência às terapias (MCCARTHY, 2012).

A terapia medicamentosa antineoplásica consiste em um dos três pilares para o tratamento do câncer de mama, juntamente com o tratamento cirúrgico e a terapia por radiação. A terapia medicamentosa é dividida em três categorias onde se encontram os fármacos citotóxicos, que além de eliminar as células cancerígenas, eliminam as células saudáveis, por causar dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico) celular, o que leva a diversos efeitos secundários (FIICH, IWASAK e PYENSON, 2010). Também existem as terapias com agentes biológicos, que utilizam anticorpos monoclonais (SCHRAMA, REISFELD e BECKER, 2006; REICHERT, VALGE-ARCHER, 2007; ADAMS e WEINER, 2005; MENDELSON, 2001; ALLEGRA et al., 2009) e as vacinas contra o câncer (GILBOA, 2007).

Por fim, o tratamento hormonal é uma importante alternativa, por interferir com as vias responsáveis pelo desenvolvimento do tumor. Este tipo de tratamento tem suma importância no câncer de mama e da próstata

(MAZZAFERRO, BOUCHEMAL e PONCHEL, 2013). Nele inclui-se o tamoxifeno e os inibidores de aromatase (GOODMAN e GILMAN, 2010).

Atualmente, a maioria das drogas antineoplásicas é administrada por via intravenosa, pois é o método mais rápido de absorção, o que leva a biodisponibilidade imediata e completa e, portanto, a dosagem exata. No entanto, esta via pode ser perigosa, devido elevada concentração do fármaco que é transferido para os tecidos normais o que leva a diversos efeitos adversos por sua ação inespecífica em todas as células do organismo (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL e PONCHEL, 2013; TERWOGT et al., 1999). Por esta razão, as doses toleradas são muito baixas. Os principais efeitos secundários são nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e mielossupressão (WHEATE et al.; 2010).

O tratamento citotóxico apesar de ser um tratamento muito eficaz em casos de câncer avançado, requer elevado desempenho do paciente à continuidade da terapia, pois necessita-se de constantes visitas ao hospital o que gera incomodo para o paciente, além de tratamento paliativo, pois pode levar a hemorragias, trombose e infecções (BORNER et al., 2001). O que torna-se relevante à terapia oral levando a melhora na adesão do paciente ao tratamento e aumento de sua sobrevida e cura da doença. Do ponto de vista econômico, a terapia oral diminui a utilização de equipamentos hospitalares, de local apropriado para infusão do fármaco, o que leva a queda nos gastos hospitalares.

Os principais fármacos anticancerígenos possuem características físico-químicas de lipossolubilidade, o que dificulta a dissolução desses fármacos no sistema gastrointestinal e torna-se fator limitante para sua absorção quando da administração por via oral. Melhorar a solubilidade aparente de tais substâncias pode resolver apenas um aspecto do problema, mas é um ponto de partida para conceber formulações farmacêuticas eficazes. Neste contexto, estratégias diferentes são utilizadas para melhorar sua solubilidade, usando excipientes farmacêuticos, sistemas de liberação modificada de fármacos ou reações químicas para formar pró-fármacos (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL e PONCHEL, 2013)

A maioria dos novos medicamentos antineoplásicos orais não são baseados em novas moléculas, mas sim em modificações nas formulações de fármacos já existentes, melhorando as características de solubilidade, absorção e toxicidade. Nota-se que a maioria dos fármacos antineoplásicos orais não são comercializados na forma de comprimidos e cápsulas, que são formas farmacêuticas simples, mas que são adaptáveis apenas a fármacos com boas características de solubilidade e absorção o que não é o caso da maioria dos antineoplásicos (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL e PONCHEL, 2013).

Essas complicações delimitam o uso oral dessas substâncias, e requerem alternativas que melhorem a solubilidade dessas moléculas. No tocante a isso, têm-se as ciclodextrinas que podem modificar as propriedades físico-químicas das moléculas, incluindo a solubilidade, através da formação de complexos de inclusão com os fármacos.

1.2- Considerações gerais sobre o Tamoxifeno

O tamoxifeno representado na Figura 1 apresenta-se como um pó cristalino, branco ou quase branco, possui escassa solubilidade em água e baixa solubilidade na acetona. É empregado atualmente na terapêutica para as seguintes situações: tratamento do câncer de mama, redução do risco de câncer de mama, carcinoma de ducto e ginecomastia (MENDES, 2002).

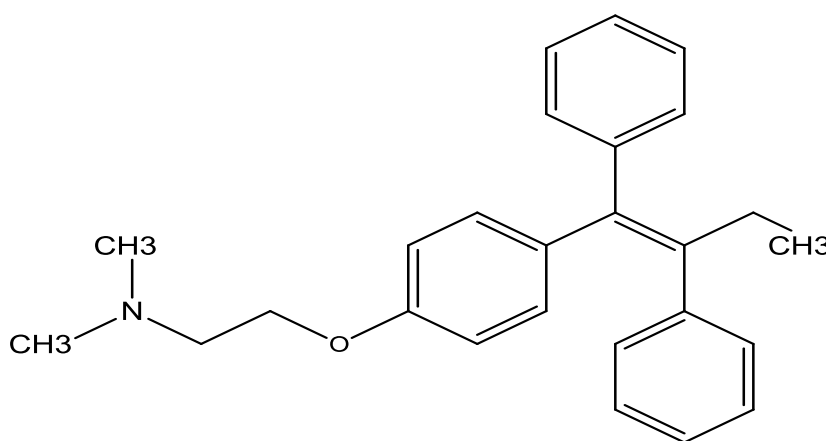


Figura 1- Estrutura Química do Tamoxifeno (Adaptado por Cibele Nabhan Benetti, realizado no programa Chembiodraw Ultra 12.0)

TAM foi sintetizado em 1963, por Dora Richardson da indústria farmacêutica *Imperial Chemical Industries PLC* (ICI), e sua utilização terapêutica primária era de agente indutor de fertilidade (JORDAM, 1988; KLOPPER e HALL, 1971). O ICI 46.474, como era inicialmente conhecido, foi o primeiro antiestrogênio sintetizado que não gerava acúmulo de desmosterol, um precursor do colesterol, que levava ao desenvolvimento de cataratas (NEWBERNE, 1966; KISTNER, 1965; HARPER e WALPOLE, 1967).

Após a síntese de TAM, pesquisadores começaram a explorar a estrutura química do fármaco e verificaram que a forma *cis* era um estrogênio e a forma *trans* um antiestrogênio. Isso levou o grupo de pesquisadores a iniciar estudos clínicos e chegar à conclusão que antiestrogênios podem ser potenciais agentes para o tratamento de câncer de mama (YANG et al., 2013)

Esta foi a primeira demonstração de contraste farmacológico entre as formas isoméricas de um mesmo agente farmacêutico (CLEMONS, DANSON e HOWELL, 2002).

Os estudos clínicos em humanos iniciaram-se em 1969 e demonstraram aumento na remissão da doença de até 34%, o que era comparativamente superior ao fármaco utilizado na época para o tratamento de câncer de mama. Estudos com outros tratamentos endócrinos incluindo androgênios, progesterona e outros antiestrogênios, além de várias formas de cirurgia demonstraram a eficácia e a segurança do tamoxifeno em monoterapia do câncer de mama avançado (CLEMONS, DANSON e HOWELL, 2002).

Em 1973, o medicamento de referência de TAM, Nolvadex®, foi aprovado no Reino Unido para o tratamento de câncer de mama (JORDAN , 1988).

No dia 30 de dezembro de 1977, após extensos ensaios clínicos para verificar a sua segurança, foi aprovado para comercialização pelo órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA (*Food and Drug Administration*) o Tamoxifeno, um supressor de estrogênio usado para tratar câncer de mama. O TAM é utilizado como uma terapia hormonal para pacientes que exibem o câncer de mama receptor de estrogênio positivo, por

atuação na diminuição da proliferação das células tumorais realizada pela competição da ligação do TAM com o estrogênio, aos receptores de estrogênios (CLEMONS, DANSON e HOWELL, 2002).

Os receptores de estrogênios são classificados como ER- α e ER- β , são semelhantes em tamanho e estrutura, que variam em torno de 530 até 600 aminoácidos. Eles contêm duas regiões, o domínio de ligação ao DNA e o domínio de ligação ao ligante. Eles trabalham em conjunto com coativadores para obter respostas hormonais e corporais (YANG et al., 2013).

O 17 β estradiol (E2) é o principal ligante que produz ação estrogênica. O tamoxifeno e outros fármacos antiestrogênicos foram inventados com base nas interações de E2 e o receptor de estrogênio no câncer de mama (LONARD e SMITH, 2002).

Os efeitos adversos relacionados ao tamoxifeno incluem sensação de calor, menstruações irregulares, sangramento ou corrimento vaginal, prurido vulvar e edema. Um dos efeitos adversos mais graves associados com tamoxifeno é um aumento da incidência de câncer do endométrio devido sua atividade estrogênica. Desde os primeiros relatos de casos em 1980, um grande número de estudos clínicos confirmou um aumento da incidência de câncer endometrial em doentes que receberam tamoxifeno (FISHER et al., 1996).

No Brasil, o tamoxifeno é comercializado na forma de sal citrato em comprimidos revestidos contendo 10 e 20 mg do fármaco. Já no mercado internacional é possível encontrar o tamoxifeno em comprimidos de 10, 20 e 40 mg, além de solução oral na concentração de 2 mg/mL (MENDES, 2002).

As propriedades físico-químicas do Tamoxifeno (Tabela 1) relatam sua baixa solubilidade, tornando-o um fármaco pouco solúvel em pH gastrointestinal, o que acarreta em dificuldade de absorção após administração oral.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do tamoxifeno.

Fármaco	Estrutura	PM (g/Mol)	PF (°C)	Log P	Solubilidade mg/mL
Tamoxifeno	C ₂₆ H ₂₉ NO	371,5	143-146	6,07	0,0099

PM indica peso molecular, PF ponto de fusão, Log P logarítmo de coeficiente experimental octanol/ água, Solubilidade do TAM em água (mg/mL)

Estas limitações mostradas na Tabela 1 são características de fármacos com baixa solubilidade aquosa o que têm motivado o desenvolvimento de diferentes estratégias com o objetivo de otimizar a ação de fármacos lipossolúveis com o intuito de melhorar a sua dissolução e consequente absorção. Muitas alternativas surgem de diferentes áreas das ciências farmacêuticas, através do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, com características que têm permitido transportar substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos do organismo, modular a velocidade de liberação em função do tempo ou formar complexos de inclusão com substâncias que alterem suas características físico-químicas (LANGER e WISE, 1984; PENA, 1990; KOCH, 1991; MAGILL, 1991). Estes sistemas podem modificar o perfil de absorção do fármaco sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA et al, 1992) o que pode ser uma ótima alternativa para fármacos com solubilidade limitada.

1.3- Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são uma família de oligossacarídeos macrocíclica ligadas por pontes α -1, 4 glicosídicas (Figura 2). Entre elas, se encontram α , β e γ - CDs que são os membros mais comuns, formados por 6, 7 e 8 unidades de D- glucopiranoose, respectivamente (MA e ZHANG, 2013).

As Cds possuem formato de um cone truncado oco, com profundidade interna de 0,79 nm, enquanto que sua porção superior e inferior são aumentadas na proporção do aumento do número de unidades glicosídicas. Possuem grupos hidroxilas voltados para o exterior da molécula, que a tornam relativamente hidrofílica e possibilitam sua dissolução em meio aquoso e uma

cavidade hidrofóbica formada por cadeias de carbono e pelo anel de dois átomos de oxigênio incluídos nas ligações glicosídicas. Esta cavidade possibilita a formação de complexos de inclusão com vários tipos de moléculas (VAN SANTVLIET et al., 1998; FERNANDES E VEIGA, 1999; SINGH, SHARMA E BANERJEE, 2002; MANZOORI, ZADEH E AMJADI, 2005; SHEN et al., 2005; GAZPIO et al., 2005, ZHANG et al., 2009).

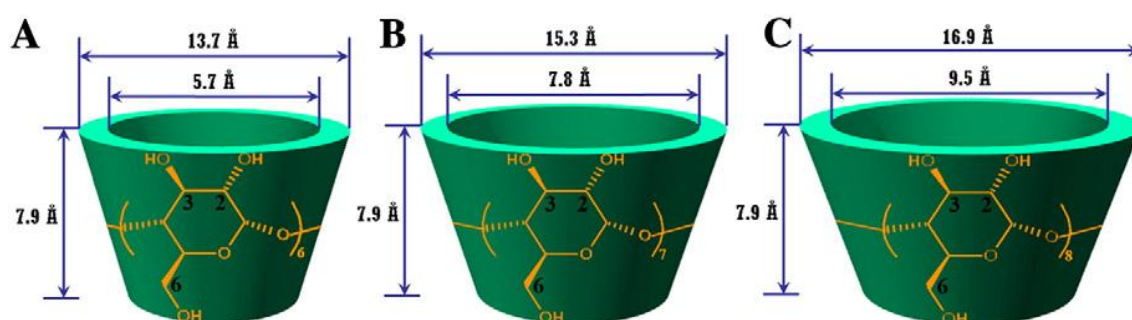


Figura 2- Estruturas moleculares das diferentes Cds, onde (A) representa a α -ciclodextrina; (B) a β -ciclodextrina e (C) a γ -ciclodextrina (Fonte: MA e ZHANG, 2013).

As CDs possuem uma cavidade hidrofóbica com capacidade de complexação com inúmeros tipos de compostos que vão desde fármacos até íons (FUCHS, HABERMANN e KLUFERS, 1993), proteínas (IRIE e UEKAMA, 1999) e oligonucleotídeos (LYSIK e WU-PONG, 2003). As aplicações farmacêuticas das CDs são extremamente atraentes devido à sua baixa toxicidade e imunogenicidade (IRIE e UEKAMA, 1997). Devido às diversas aplicações tecnológicas das CDs, elas têm sido extensivamente utilizadas na indústria farmacêutica para formação de complexos com drogas através de interações para formação de complexos de inclusão. Estes complexos demonstram aplicabilidade na melhora da solubilidade e estabilidade do fármaco (BREWSTER e LOFTSSON, 2007) o que pode levar a um aumento de sua absorção (CARRIER, MILLER e AHMED, 2007). Possuem capacidade de mascarar odores e sabores indesejáveis (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE, 1998), adaptar-se a sistemas de liberação controlada (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999) e minimizar os efeitos de toxicidade local e sistêmica por facilitação da biodisponibilidade, o que leva a utilizar-se de doses menores diminuindo assim

a quantidade de fármaco acumulada nos tecidos (LOFTSSON e BREWSTER, 2011; DAVIS e BREWSTER, 2004).

A incorporação de moléculas na cavidade das CDs é permitida devido às forças eletrostáticas, ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênios, entre outras. Essas forças possuem efeito sinérgico e estão relacionadas com as características do fármaco que irá se hospedar na cavidade da CDs, como o formato, o volume, a polaridade, número e características dos substituintes, a temperatura, e o meio da reação. Todas essas características afetam de forma direta a forma e a força das ligações (SONG et al.,2009).

Os modelos de complexação mais comumente encontrado estão apresentados na Figura 3.

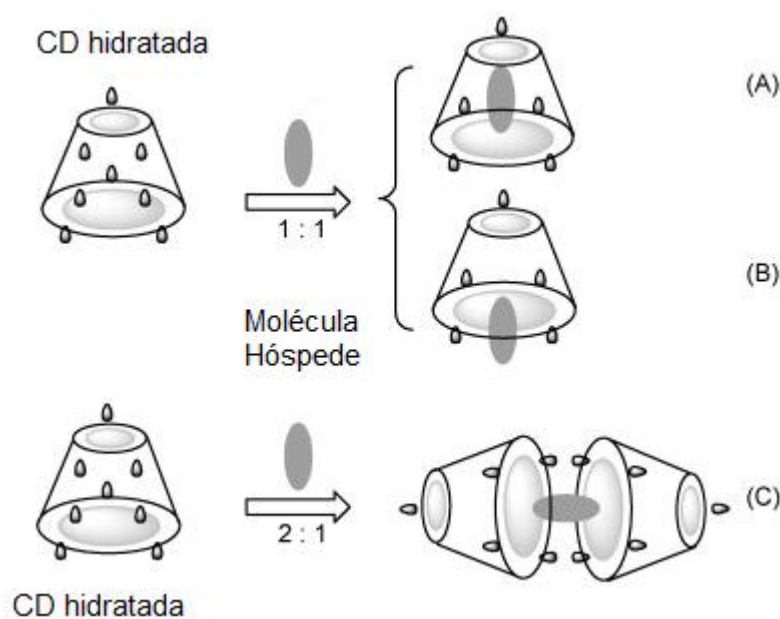


Figura 3- Esquematização dos modelos de complexação mais comumente encontrados. Sendo (A) complexação total da molécula; (B) complexação parcial e (C) complexação “sanduíche” (Fonte: Adaptado pelo proposto por Song e colaboradores, 2009).

Dentre as ciclodextrinas existentes, a β CD (Figura 4) tem sido a mais comumente utilizada como agente complexante, devido ao fato de seu anel apresentar as dimensões mais propícias para a maioria das moléculas de

fármacos (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE, 1998; SINGH, SHARMA e BANERJEE, 2002; ASHFORD, 2005).

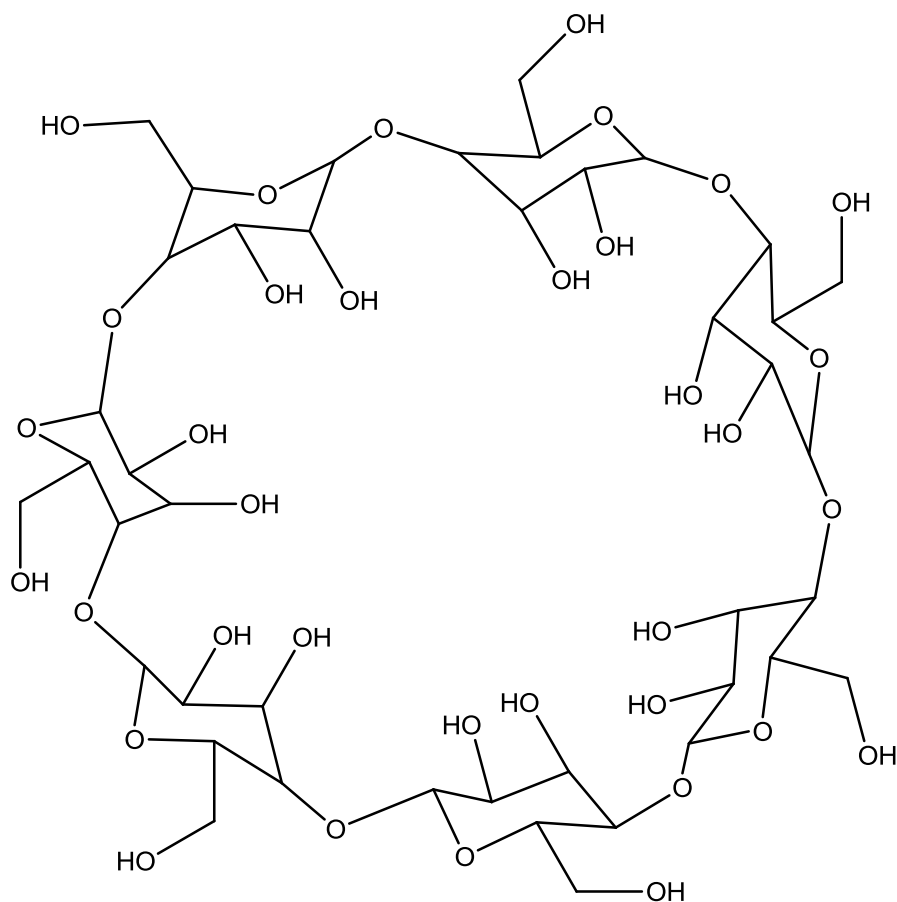


Figura 4- Estrutura molecular da β - ciclodextrina (Adaptado por Cibele Nabhan Benetti, realizado no programa Chembiodraw Ultra 12.0)

A β CD, também conhecida como ciclomalto-heptose, cicloheptaglicano ou cicloheptamilose, vem sendo amplamente utilizada, devido ao seu baixo custo, alta taxa de produtividade, fácil aquisição e capacidade de inclusão de inúmeros fármacos (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999; FERNANDES e VEIGA, 1999; LOFTSSON, 2000; RAWAT e JAIN, 2004; LIU et al., 2005; LIU e ZHU, 2005 ; ZINGONE e RUBESSA, 2005).

A β CD tem uma massa molecular de aproximadamente 1135 g mol^{-1} e faixa de fusão entre 255 e $265 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume da cavidade é caracterizado em $262 \text{ \AA}^3$, a qual é apropriada para fármacos comuns com peso molecular entre 200 e 800 g mol^{-1} (WALECZEK et al., 2003; FLORENCE e ATTWOOD, 2003; ZINGONE e RUBESSA , 2005).

Uma das mais importantes aplicações das β CD no âmbito farmacêutico inclui a sua utilização para aumentar a solubilidade em água de fármacos por meio da formação de complexos de inclusão com inúmeros tipos de moléculas. A habilidade das CDs de solubilizar substâncias pode ser quantitativamente avaliada pelo estudo de solubilidade dos complexos proposto por Higuchi e Connors (1965). Por esta análise é possível verificar a afinidade entre o fármaco e a CDs, além de determinar a melhor razão molar entre eles. De acordo com a estequiometria dos complexos, formam-se diferentes perfis de solubilidade (Figura 5), que são classificados como sendo do tipo A (forma-se complexos solúveis) que ainda pode ser subclassificado como AL, AP e AN, sendo que o AL verifica-se aumento linear da solubilidade do fármaco com o aumento da proporção de ciclodextrinas. No tipo AP, verifica-se a complexação de mais de uma molécula de ciclodextrina ao fármaco, o que leva a um desvio positivo no gráfico de solubilidade de fases em relação ao AL. O tipo AN, está relacionado a modificações nas características do solvente, devido a altas concentrações da CDs, levando a um desvio negativo no diagrama de fases quando relacionada à curva AP (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE,1998; ZERROUK et al., 1998).

O Diagrama do tipo B (Figura 5) é subdividido em Bs e Bi, sendo o Bs inicialmente semelhante ao do tipo AL, porém com adição elevada de CDs ocorre um platô, onde os níveis de solubilidade decrescem. O do Tipo Bi é incomum e ocorre a formação de complexos insolúveis em água (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE,1998; VIANNA et al., 1998).

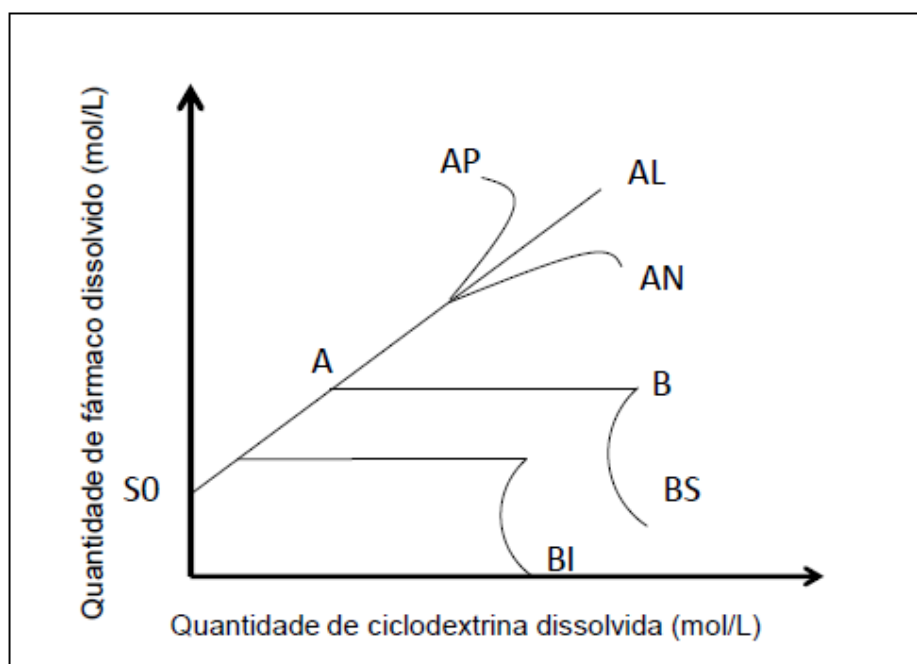


Figura 5- Diagrama de solubilidade de fases descrita por Higuchi e Connors (1965). Onde S0 representa a solubilidade intrínseca do fármaco puro (Fonte: Adaptado da dissertação de José Arthur Lopes Júnior, 2010).

Inúmeros trabalhos têm sido publicados relatando a eficiência da formação de complexos entre a β CD e vários fármacos, bem como a sua capacidade de alterar as propriedades físico-químicas dos mesmos, em especial a solubilidade. Dentre os fármacos estudados encontram-se a hidrocortisona (CAVALLI et al., 1999), o aciclovir (ROSSEL et al., 2000), o atenolol (FICARRA et al., 2000), a carbamazepina (KOESTER et al., 2003), a ampicilina (AKI et al., 2004); o celecoxibe (REDDY et al., 2004; RAWAT e JAIN, 2004; MANZOORI, ZADEH e AMJADI, 2005), o valdecoxibe (RAJENDRAKUMAR, MADHUSUDAN e PRALHAD, 2005), o cloridrato de prazosina (LIU E ZHU, 2005), a varfarina (ZINGONE e RUBESSA, 2005), o clotrimazol (BILENSOY et al., 2006), clorexidina (DENADAI et al., 2007), risperidona (DANEL et al., 2008) a trazodona (MISIUK e ZALEWSKA, 2009), a sertralina (SINISTERRA et al., 2012), a sibutramina (CHO et al., 2012) e o norfloxacino (LOH, TAN e PEH, 2014).

Segundo Del Valle (2004) a constante de solubilidade aparente (K_c) pode indicar a melhor razão estequiométrica do complexo. É um parâmetro empírico que descreve o aumento da solubilidade aparente do fármaco em

presença de CDs (RODRIGUES, 2010). O K_c mede a força do complexo formado, quanto mais intensa a ligação maior é o valor de K_c (LOPES, 2010). Considerando uma razão estequiométrica entre o fármaco e a β CD pode ser calculado de acordo com a expressão abaixo:

$$K_c = b \div S_0(1 - b) \quad (\text{equação 1})$$

Onde, “ S_0 ” é a solubilidade intrínseca do fármaco na ausência de β CD, e “ b ” o coeficiente angular da reta. Quanto mais próximo de 1 o valor de “ b ” prediz que o complexo formado é de estequiometria 1:1. Já em valores de “ b ” maiores que 1 provavelmente complexos de estequiometrias de maior ordem são formados.

1.4- Formas Farmacêuticas de liberação modificada

O regime posológico para muitas doenças crônicas, onde é necessária a administração de doses frequentes para que se mantenha a dose terapêutica, dificulta a continuidade do tratamento por prejudicar a adesão do paciente ao esquema terapêutico. A administração de doses orais convencionais é um modelo onde ocorre a liberação imediata do fármaco para agir sistemicamente, podendo gerar flutuações nas concentrações plasmáticas terapêuticas entre as doses sucessivas. Isto é, levando o paciente a ser sobremedicado ou submedicado, podendo apresentar diminuição da eficácia terapêutica ou toxicidade. Neste sentido, o controle da velocidade de liberação do fármaco, principalmente em doenças crônicas como o câncer de mama, faz-se necessário. São estas limitações que levam os pesquisadores a modificar as formulações de liberação imediata com o objetivo de aperfeiçoar o esquema posológico do paciente minimizando assim, os efeitos adversos por altas doses dos fármacos nos tecidos, a fim de manter a concentração terapêutica eficaz, além de conforto para o paciente, resultante da diminuição do número de doses necessárias, otimizando o controle da doença o que resulta em diminuição de gastos hospitalares (Aulton, 2008).

Cada sistema de liberação justifica-se na minimização das variações das concentrações plasmáticas dos fármacos, quando da administração do sistema convencional. Devido notória diferença na classificação dos diferentes sistemas

de liberação modificada e confusão de sua denominação semântica, estes sistemas são descritos abaixo:

- *Liberação retardada*: O fármaco não é liberado imediatamente após a sua administração, e sim um tempo depois. Os comprimidos com revestimento gastro-resistentes, aos quais modulam a sua liberação no pH intestinal conferindo proteção contra enzimas e pH estomacal, são exemplos desse tipo de liberação. Nestes sistemas a C_{max} ¹ é praticamente a mesma dos fármacos convencionais, já o valor de t_{max} ² é maior devido à modulação da liberação com impedimento de sua dissolução no pH estomacal. (JANTZEN e ROBINSON, 1996; SHARGEL e YU, 1999; HIRAYAMA e UEKAMA, 1999; ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; AULTON, 2008).
- *Sistemas de liberação lenta*: Não são comparáveis a liberação controlada. Objetivam-se na liberação lenta do fármaco, prevenindo sua concentração plasmática elevada e assim, os efeitos indesejáveis existentes na liberação convencional. O t_{max} neste caso, também será elevado (JANTZEN e ROBINSON, 1996; SHARGEL E YU, 1999; ANSEL, POPOVICH E ALLEN, 2000; BERROZPE E FERRER, 2003).
- *Sistemas de liberação prolongada*: Conhecido também como liberação sustentada são sistemas que indicam que o fármaco é disponibilizado para absorção por um período de tempo mais prolongado, quando comparado à forma farmacêutica convencional. Como sua liberação tende a se manter constante, o valor de t_{max} , geralmente é determinado pelo tempo durante o qual se mantém a concentração plasmática em estado de equilíbrio. (CHIEN, 1992; JANTZEN e ROBINSON, 1996; SHARGEL e YU, 1999; HIRAYAMA e UEKAMA, 1999; ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; BERROZPE e FERRER, 2003; AULTON, 2008).

1 Concentração plasmática máxima em unidades de massa/volume.

2 Tempo no qual a concentração plasmática do fármaco é máxima.

- *Sistemas de liberação controlada*: Estes sistemas tendem a liberar o fármaco a uma velocidade constante de ordem zero, o que propicia concentrações plasmáticas invariáveis com o tempo (AULTON, 2008).
- *Liberação repetida*: Justifica-se na liberação de uma dose individualizada após sua administração, e subsequentemente liberações de doses sucessivas em intervalos intermitentes. Este tipo de sistema é utilizado para fármacos que permitem sua administração várias vezes ao dia, dificultando a adesão do paciente ao tratamento, eliminando assim, o número de doses administradas (AULTON, 2008). A c_{max} e t_{max} são praticamente idênticas à formulação convencional, pois neste caso não há modulação da velocidade de liberação do ativo.

A Figura 6 ilustra os perfis hipotéticos dos diferentes sistemas de liberação em comparação com o sistema de liberação convencional. A forma farmacêutica convencional demonstrada juntamente com a de liberação repetida mostrou que há picos acima da concentração plasmática terapêutica ou sua defasagem, ocasionados pela rápida liberação do ativo.

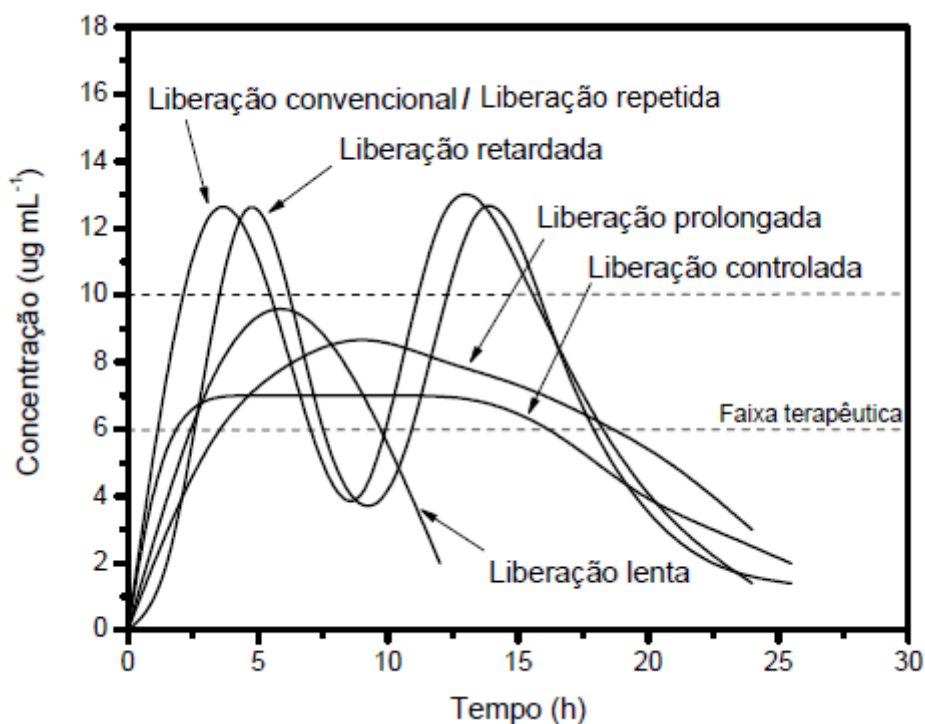


Figura 6- Comparação dos diferentes sistemas de liberação de fármacos
(Fonte: Adaptada, RODRIGUES, 2005).

1.5- Matrizes Hidrofílicas

Como mecanismo promissor para liberação de um ativo faz-se necessário à escolha de um agente adequado para controle da liberação de um fármaco. Estes agentes devem possuir características básicas, como a capacidade de promover a dissolução do fármaco no meio solubilizante e a difusão das espécies dissolvidas, para promoção da ação (AULTON, 2008).

Apesar de existirem uma variedade de sistemas poliméricos empregados na preparação de formas farmacêuticas de liberação prolongada de fármacos, os polímeros hidrodispersíveis, derivados da celulose, são provavelmente o grupo mais amplamente utilizados (COLOMBO, 1993; LOPES, LOBO e COSTA 2005; 2011; STRUSI et al., 2010 SHIM et al., 2011).

Os sistemas matriciais de liberação hidrofílicos são também chamados de matrizes intumescíveis ou solúveis. Dentro deste grupo de substâncias se encontram o HPMC que é um dos mais importantes polímeros hidrofílicos utilizado para liberação prolongada (DOELKER, 1986; COLOMBO, 1993)

O HPMC também conhecido como hipromelose é um éter de propilenoglicol da metilcelulose, demonstrada na Figura 7. Ele é derivado da celulose, através de tratamentos com cloreto de metila, produzindo grupamentos metoxil e com óxido de propileno, dando origem a grupamentos hidroxipropil. Como os tratamentos ocorrem de forma não simultânea, pode-se produzir moléculas apenas com radicais metoxil ou hidroxipropil, ou ainda optando por trabalhar com proporções, variando desta maneira as características das diferentes espécies de hipromelose (RODRIGUES, 2005). O grupamento R corresponde a um grupo metoxila, hidroxipropila ou átomo de hidrogênio. Esses diferentes grupamentos propiciam diferenças nas propriedades físico-químicas do HPMC de acordo com o número de substituintes na sua estrutura molecular (SIEPMANN, 2012)

A hipromelose pode apresentar-se por quatro diferentes tipos de acordo com as novas especificações da USP 28^a ed (*The United States*

Pharmacopeia, 2005). As diferentes classificações do HPMC são de acordo com o número de substituintes metoxil e hidroxipropil. São eles o HPMC 1828, HPMC 2208, HPMC 2906 e HPMC 2010. Estes polímeros estão disponíveis em diversos pesos moleculares e são classificadas com base na sua viscosidade, aferida numa solução a 2 % em água (FORD, 1999; THE UNITED, 2005)

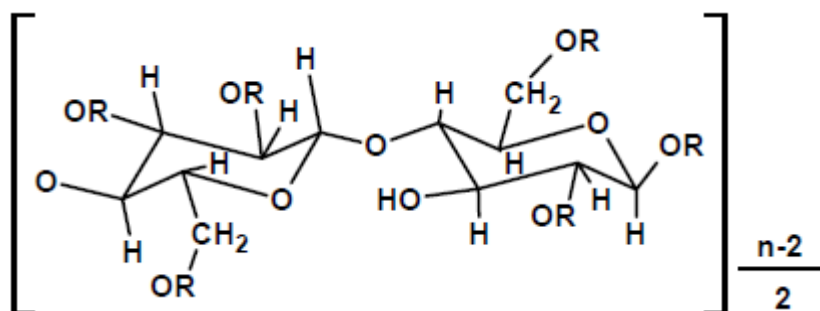


Figura 7- Estrutura química do HPMC (Fonte: Rodrigues, 2005)

O HPMC 2208, também chamado de HPMC K é o mais amplamente utilizado como recurso de promoção da extensão da liberação de fármacos, apresentando basicamente três tipos, os quais diferem pelas distintas viscosidades, possuindo as mesmas características relacionadas aos substituintes hidrofílicos e hidrofóbicos. (RODRIGUES, 2005). A Tabela 2 ilustra as características de viscosidade segundo a USP 28^aEd (2005).

Tabela 2- Características dos diferentes tipos de HPMC 2208 (Fonte: Rodrigues, 2005)

Tipo	Viscosidade (m.Pa.s) ^a	Designação USP	Metoxil (%)	Hidroxipropil (%)
K4M	2903	2208	7-12	19-24
K15M	7382	2208	7-12	19-24
K100M	18243	2208	7-12	19-24

^a Viscosidade média verificada com uma solução aquosa 2 % (m/v) na temperatura de 20 °C de acordo com a USP 28^a ed.

O sistema pelo qual estes polímeros desenvolvem a liberação prolongada baseia-se que em contato com a água os coloides hidrofílicos intumescem e formam uma camada de matriz gelificada e viscosa. Esta, por

sua vez, controla a difusão da água para o interior da matriz retardando a saída do fármaco por difusão da matriz. À medida que a matriz fica mais solúvel no meio, sofre erosão que é preferível para liberação de fármacos insolúveis em água (AULTON, 2008). A Figura 8 demonstra o esquema de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação intumescíveis.

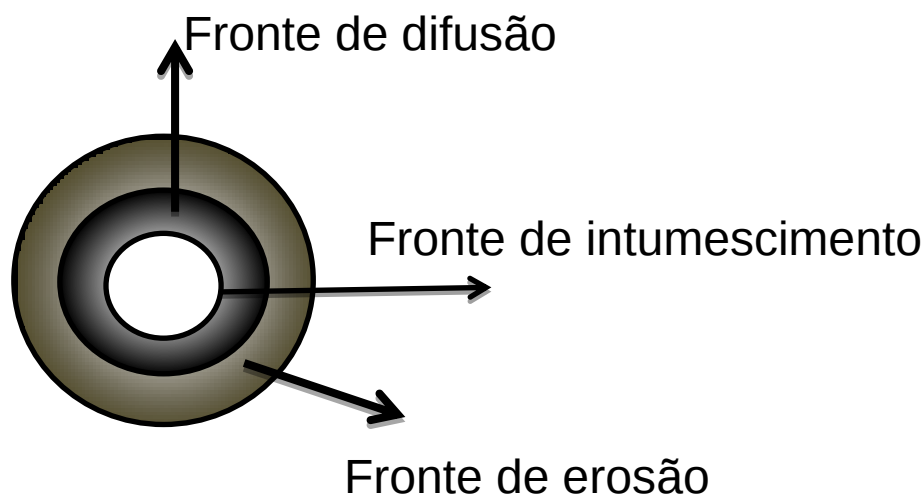


Figura 8- Esquema ilustrativo das fronteiras de movimento durante a liberação do fármaco a partir de sistemas intumescíveis (Fonte: Cibeles Nabhan Benetti).

O mecanismo pelo qual ocorre a liberação dos fármacos a partir de sistemas poliméricos hidrofílicos está associado à passagem do polímero da transição vítrea (T_g) para um estado maleável que é resultante da penetração de água na matriz acometendo as ligações entre as cadeias dos polímeros, ocasionando ruptura nas ligações de hidrogênios passando para um novo estado de solvatação. Desse modo, ocorre diminuição na temperatura de T_g , passando a matriz para um estado com mais mobilidade, que ocorre na frente de intumescimento (COLOMBO, 1993; COLOMBO et al., 1999; COLOMBO et al., 2000; KATZHENDLER, MÂDER e FRIEDMAM, 2000; LOPES, LOBO e COSTA, 2005). A frente de difusão é um local que já se tem a formação da camada de gel e podem coexistir fármacos solubilizados e não solubilizados. Os fármacos dissolvidos são difundidos para o meio exterior por meio da frente de erosão, que corresponde à fronteira entre o meio de dissolução e a superfície da matriz. Na frente de erosão da estrutura matricial verifica-se o afastamento e a solubilização das cadeias poliméricas e a subsequente

liberação do fármaco. (COLOMBO, 1993; COLOMBO et al., 1999; COLOMBO et al., 2000; KATZHENDLER, MADER e FRIEDMAM, 2000; LOPES, LOBO e COSTA, 2005).

Atualmente o PEO também é utilizado como agente formador de géis, formando matrizes intumescidas na presença de água. Desta forma, sua utilização nos sistemas de liberação prolongada é interessante para indústria farmacêutica.

Em trabalho recente realizado por Vervaet e colaboradores (2012) utilizaram matrizes hidrofílicas de PEO juntamente com acetato de etilenovinil para sistemas de liberação prolongada. PEO tem sido utilizado com sucesso para aumentar a liberação da droga a partir de matrizes hidrofóbicas. Como as cadeias de PEO incham em contato com o meio aquoso, rompem a estrutura de matriz hidrofóbica facilitando o acesso do líquido de dissolução na matriz de acetato de etilenovinil, liberando o ativo (VARMA, SINGLA E DHAWAN, 2004).

O perfil de liberação de um fármaco a partir de sistemas matriciais hidrofílicos é fortemente influenciado pelas características de solubilidade de um fármaco. No entanto, em casos onde a solubilidade do fármaco torna-se restrita tornando-se um fator limitante para liberação do princípio ativo faz-se necessário o uso de técnicas que melhorem a solubilidade desse fármaco como a formação de complexos de inclusão com as ciclodextrinas, dessa forma aumentando sua performance de solubilidade intrínseca e então conseguindo liberar o fármaco a partir dos sistemas poliméricos (COLOMBO et al., 1996; SANGALI et al., 2001; RIBEIRO, FERREIRA e VEIGA, 2005).

Devido às funcionalidades dos sistemas de liberação a partir de matrizes hidrofílicas vários trabalhos têm descrito o uso de polímeros hidrofílicos em formulações orais juntamente com ciclodextrinas para melhoria da solubilidade de fármacos lipossolúveis. Como exemplos tem-se a carbamazepina- β -ciclodextrinas (BASSANI et al., 2004) incorporadas em comprimidos de HPMC para melhora da solubilidade e liberação prolongada, o Benzinidazol- β -ciclodextrinas (NUNES, et al., 2012) também formuladas com HPMC para liberação prolongada e o acetato de dexametasona- β -ciclodextrinas liberados

a partir de matrizes hidrofílicas de HPMC e PEO de alto peso molecular (RODRIGUES, et al., 2007).

Referências Bibliográficas

ADAMS, G.P.; WEINER, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature biotechnology**. v.23, p.1147-1157, 2005.

ALLEGRA, C.J.; JESSUP, J.M.; SOMERFIELD, M.R.; HAMILTON, S.R.; HAMMOND, E.H.; HAYES, D.F.; MCALLISTER, P.K.; MORTON, R.F.; SCHILSKY, R.L. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. **Journal of Clinical Oncology**. v. 12, p.2091–2096, 2009.

AKI, H.; NIIYA, T.; IWASE, Y.; KAWASAKI, Y.; KUMAI, K.; KIMURA, T. Multimodal inclusion complexes of ampicillin with β -cyclodextrins in aqueous solution. **Thermochimica Acta**. v. 416, p. 87-92, 2004.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6ª edição, Editorial Premier, São Paulo, Brasil. p.568, 2000.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: Aulton, M.E. **Delineamento de Formas FARMACÊUTICAS**. 2.ED. SÃO PAULO: ARTMED, P. 245-263, 2005.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. Ed. São Paulo: Artmed p. 298-312, 2008.

BASSANI, V.L.; MOELLERKE, R.; MAYORGA, P.; COSTA, T.D.; KOESTER, L.S.; BERTUOL, J.B.; GROCH, K.R.; XAVIER, C.R. Bioavailability of carbamazepine: β -cyclodextrin complex in beagle dogs from hydroxypropylmethylcellulose matrix. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 22, p. 201-207, 2004.

BERROZPE, J.D.; FERRER, E.E. Preparados orales de cesión modificada: cinética. In: Berrozpe, J.D.; LanaO, J.M.; Delfina, J.M.P. **Biofarmacia y Farmacocinética**. vol. 2. Madrid: Editorial Sintesis, p.591, 2003.

BILENSOY, E.; ROUF, M.A.; HINCAL, A.A. Thermosensitive vaginal gel formulation for the controlled release of clotrimazole via complexation to beta-cyclodextrin. **Journal of Controlled Release**. v.116 (2), 107-109, 2006.

BORNER, M.; SCHEITHAUER, W.; TWELVES, C.; MAROUN, J.; WILKE, H. Answering patients' needs: oral alternatives to intravenous therapy. The **Oncologist**. v. 6 (Suppl. 4) p.12–16, 2001.

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

CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal Controlled Release**. v.123, p.78–99, 2007.

CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M.R.; Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 182, p. 59-69, 1999.

CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 797, 1992.

CHO, B.K.; NAM, Y.S.; SHIM, D.C.; HWANG, Y.Y. Characterization, stability, and pharmacokinetics of sibutramine/b-cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 18 p.1412–1417, 2012.

CLEMONS, M.; DANSON, S.; HOWELL, A. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review. **Cancer treatment reviews**. v. 28, p.165–180, 2002.

COLOMBO, P. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. **Advance Drug Delivery Reviews**, v.11, p 37-57, 1993.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N.A.; DE ASCENTIS, A. **Journal of Controlled Release**. v.39, p.231-237, 1996.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; CATELLANI, P.L.; SANTI, P.; PEPPAS, N.A. Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.9, p.33-40, 1999.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N.A. Swellable matrices for controlled drug release: gel-layer behavior, mechanisms and optimal performance. **PSTT**. v.3, n.6, p.198-204, 2000.

DANEL, C.; AZAROUAL, N.; BRUNEL, A.; LANNOY, B.; VERMEERSCH, G.; ODOU, P.; VACCHER, C. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and H^1 NMR spectroscopy. **Journal of Chromatography A**. v.1212 (1-2), 185-193, 2008.

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

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process biochemistry**. v.39, p.1033-1046, 2004.

DENADAI, Â.M.L.; TEIXEIRA, K.I.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, A.M.C.; CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**. v.342 (15), 2286-2296, 2007.

DOELKER, E. **Water-swollen cellulose derivatives in pharmacy**, in: Peppas, N.A. (Ed.). *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. vol. 2, CRC Press, Boca Raton, p. 115–160, 1986.

FERNANDES, F.M.; VEIGA, F.J.B. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica. I Produção, estrutura e propriedades. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 20 n. 2, p. 335-351, 1999.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; BELLA, M.R.D.; RANERI, D.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M.L.; VILLARI, A; COPPOLINO, S. Study of the inclusion complex of atenolol with β -ciclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 23, p. 231-236, 2000.

FISHER, B.; DIGNAM, J.; BRYANT, J.; DECILLIS, A.; WICKERHAM, D.L.; WOLMARK, N. Five versus more than 5 years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumours. **Journal National Cancer Institute**. V.88, p.1529-1542, 1996.

FITCH, K.; IWASAK, K.; PYENSON, B. Parity for oral and intravenous injected cancer drugs. **Milliman Client Report**. p. 1–20, 2010.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**.

FORD, J.L. Thermal analysis of hydroxypropylmethylcellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 209-228, 1999.

FUCHS, R.; HABERMANN, N.; KLUFERS, P. Multinuclear sandwich-type complexes of deprotonated β -cyclodextrin and copper(II) ions. **Angewandte Chemie International**. ed. 32, p.852–854, 1993

GILBOA, E.DC-based cancer vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**. v.117, p.1195–1203, 2007.

GAZPIO, C.; SÁNCHEZ, M.; ZUBIRI, I.X.G.; VÉLAZ, I.; OHÁRRIZ, C.M.; MARTIN, C.; ZORNOZA, A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol an cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, p. 487-492, 2005.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. Manual de farmacologia e terapêutica.1 ed, Porto Alegre: AMGH, p. 907-908, 2010.

HARPER, M.J.K.; WALPOLE, A.L. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. **Journal of reproduction and fertility**. v. 13, p.101-119, 1967.

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

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 36, p.125–141,1999.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; ALTEKRUSE, S. F.; et al. SEER cancer statistics review 1975–2009. **NIH publication**. Bethesda, MD.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2012.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 86, p.147–162, 1997.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. . **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.36, p.101–123, 1999.

JANTZEN, G.M.; ROBINSON, J.R. Sustained and Controlled-Release Drug Delivery Systems. In: Banker, G.S.; Rhodes, C.T. **Modern Pharmaceutics**. 3 ed. vol. 72, New York: Marcel Dekker, Inc., p.943, 1996.

JORDAN, V. C. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur L. Walpole. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 11, p.197–209, 1988.

JÚNIOR, J.A.L. Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa, 2010.

KATZHENDLER, I.; MÂDER, K.; FRIEDMAN, M. Structure and hydration properties of hydroxypropyl methylcellulose matrices containing naproxen and naproxen sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p.161-179, 2000.

KISTNER, R.W. Induction of ovulation with clomiphene citrate (Clomid). **Obstetric Gynecol Surv.** v. 20, p.873-900, 1965.

KLOPPER, A.; HALL, M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. **British medical journal**, v.1, p.152-154, 1971.

KOCH, H.P. Controlled drug delivery systems. **Scientia Pharmaceutica.** v. 59, p. 85-100, 1991.

KOESTER, L.S.; XAVIER, C.R.; MAYORGA, P.; BASSANI, V.L. Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v. 55, p.85-91, 2003.

LANGER, R.S.; WISE, D.L. **Medical application of controlled release.** Boca Raton: CRC Press, 1984.

LIU, Y.; CHEN, G.S.; CHEN, Y.; LIN, J. Inclusion complexes of azadirachtin with native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 13, p. 4037-4042, 2005.

LIU, L.; ZHU, S. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 2005.

LOFTSSON, T. Aplicações Farmacêuticas da β -ciclodextrina. **Pharmaceutical Technology.** v. 4 n.1, 2000.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 63, p. 1119–1135, 2011.

LOH, G.O.K.; TAN, Y.T.F.; PEH, K.K. Effect of HPMC concentration on β -cyclodextrin solubilization of norfloxacin. **Carbohydrate Polymers.** v. 101, p. 505–510, 2014.

LONARD, D.M.; SMITH, C.L. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): Progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. **Steroids**. v. 67, p.15-24, 2002.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA,P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.2, p.143-154, 2005.

LOPES, J.A.P.; Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa, São Paulo-SP, 2010.

LYSIK, M.A.; WU-PONG, S. Innovations in oligonucleotide drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 92 ; p.1559–1573, 2003.

MAGILL, M. **Microencapsulation. Cosmetics & Toiletries**, v. 3, p. 54-57, 1991.

MANZOORI, J.L.; ZADEH, H.A.; AMJADI, M. Study on the complex between B-cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application. **II Farmaco**. v. 60, p. 575-581, 2005.

MA, P.X.; ZHANG, J. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, p.1215–1233, 2013.

MAZZAFERRO, S.; BOUCHEMAL, K.; PONCHEL, G. Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations. **Drug Discovery Today**. v.18, p.25-34, 2013.

MCCARTHY, N.Breast cancer: Genes, genes everywhere. **Nature Reviews Cancer**. v. 12, p.507-507, 2012

MENDELSON, J.The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. **Endocrine-Related Cancer**. v. 8, p.3-9, 2001.

MENDES, F. V. L. Tamoxifeno. In: BERMUDEZ, J. A. Z. **Fundamentos Farmacológicos Clínicos dos Medicamentos de uso corrente**. Rio de Janeiro: ENSP, 2002.

MISIUK, W.; ZALEWSKA, M. Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**. v. 77, p. 482-488, 2009.

NEWBERNE, J.W.; KUHN, W.L.; ELSEA, J.R. Toxicologic studies on clomiphen. **Toxicology and Applied pharmacology**. v.9, p.44-56, 1966.

NUNES, L.C.C.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; LIMA, A.A.N.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; TORRES-LABANDEIRA, J.J. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**. v. 89, p.323– 330, 2012.

OLIVEIRA, A.G.de; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e nanocápsulas: um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 14, p. 37-49, 1992.

PENA, M.B. Microesferas: aspectos tecnológicos y aplicaciones farmacêuticas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 9, p. 53-64, 1990.

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

RAWAT, S.; JAIN, S.K. Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 57, p. 263-267, 2004.

REDDY, M.N.; REHANA, T.; RAMAKRISHNA, S.; CHOWDARY, K.P.R.; DIWAN, P.V. β -Cyclodextrin Complexes of Celecoxib: Molecular-Modeling, Characterization, and Dissolution studies. **AAPS PharmSci**. v. 6, n. 1, artigo 7, 2004.

REICHERT, J.M.; VALGE-ARCHER, V.E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery** .v. 6, p.349-356, 2007.

RIBEIRO, L.; FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. In vitro controlled release of vinpocetine-cyclodextrin-tartaric acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets. **Journal of Controlled Release**. v. 103, p. 325-339, 2005.

RODRIGUES, P.O. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação de formas farmacêuticas de liberação prolongada do antiretroviral zidovudina (azt)**. Florianópolis-SC, 2005.

RODRIGUES, P.O.; FORTUNATO, K.A.; DOILE, M.M.; SCHMÜCKER, I.C.; SCHUCKO, S.K.; SILVA, M.A.S. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26(4), p. 513-521, 2007.

RODRIGUES, P.O. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de complexos dexametasona-B-ciclodextrina**. Florianópolis-SC, 2010.

ROSSEL, C.V.P.; CARREÑO, J.S.; BAEZA, M.R.; ALDERETE, J.B. Inclusion complex of the antiviral drug acyclovir with cyclodextrin in aqueous solution and in solid phase. **Química Nova**. v. 23, n. 6, p. 749-752, 2000.

SANGALI, M.E.; ZEMA, L.; MARONI, A.; FOPPOLI, A.; GIORDANO, F.; GAZZANIGA, A. Influence of betacyclodextrin on the release of poorly soluble drugs from inert and hydrophilic heterogeneous polymeric matrices. **Biomateriais**. v. 22, p.2647-2651, 2001.

SCHRAMA, D.; REISFELD, R.A.; BECKER, G.C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery** . v.5, p.147-159, 2006.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 4 ed., New York: McGraw-Hill, p.768, 1999.

SHEN, Y.L.; YANG, S.H.; WU, L.M.; MA, X.Y. Study on structure and characterization of inclusion complex of gossypol/beta cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 61, p. 1025-1028, 2005.

SHIM, B.H.; KIM, D.K.; YE, J.S.; LEE, J. Gastro-floating matrices designed for simultaneous improvement of floating and drug release capabilities: an in vitro case study of matrices loaded with ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.21,p. 279–281, 2011.

.SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. C. A Cancer Journal Clinicians. v. 62, p.10-29, 2012.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v.161, p.351–362, 2012.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 341-359, 2002.

SINISTERRA, R.D.; PASSOS, J.J.; SOUSA, F.B.; MUNDIM, I.M.; BONFIM, R.R.; MELO, R.; VIANA, A.F.; STOLZC, E.D.; BORSOI, M.; RATES, S.M.K. In vivo evaluation of the highly soluble oral B-cyclodextrin–Sertraline supramolecular complexes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 436, p. 478–485, 2012.

SONG, L.X.; BAI, L.; XU, X.M.; HE, J.; PAN, S.Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, p. 1276-1284, 2009.

STRUSI, O.L.; BARATA, P.; TRAINI, D.; YOUNG, P.M.; MERCURI, S.; COLOMBO, G.; SONVICO, F.; BETTINI, R.; COLOMBO, P. Artesunate-clindamycin multi-kinetics and sitespecific oral delivery system for antimalaric combination products. **Journal of Controlled Release**. V.146, p.54–60, 2010.

TERWOGT, J.M.M.; SCHELLENS, J.H.M.; BOKKEL, W.W.; BEIJNEN, H.J.H. Clinical pharmacology of anticancer agents in relation to formulations and administration routes. **Cancer Treatment Reviews**. v.25, p.83–101, 1999.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 28 ed. Rochville: **United States Pharmacopoeial Convention**, 2005.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**. v.98, p.2045–2076, 1998.

VAN SANTVLIET, L.; CALJON, K.; PIETERS, L.; LUDWIG, A. Physicochemical properties, NMR spectroscopy and tolerance of inclusion complexes of antazoline and tetracaine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 171, p. 147-156, 1998.

VARMA, M.; SINGLA, A.K.; DHAWAN, S. Release of diltiazem hydrochloride from hydrophilic matrices of polyethylene oxide and carbopol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.30, p.545–553, 2004.

VERSAET, C.; ALMEIDA, A.; BRABANT, L.; SIEPMANN, F.; DE BEER, T.; BOUQUET, W.; VAN HOOREBEKE, L.; SIEPMANN, J.; REMON, J.P. Sustained release from hot-melt extruded matrices based on ethylene vinyl acetate and polyethylene oxide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p.526-533, 2012.

VIANNA, R.F.L.; BENTLEY, M.V.L.B.; RIBEIRO, G.; CARVALHO, F.S.; NETO, A.F.; OLIVEIRA, D.C.R.; COLLETT, J.H. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.167, p.205-213, 1998.

WALECZEK, K.J.; CABRAL MARQUES, H.M.; HEMPEL, B.; SCHIMIDT, P.C. Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 55, p.247-251, 2003.

WHEATE, N.J.; WALKER, S.; CRAIG, G.E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**. v. 39, p.8113–8127, 2010.

YANG, G.; NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; GEORGAKILAS, A.G. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**. v.139, p.392–404, 2013.

ZHANG, M.; LI, J.; ZHANG, L.; CHAO, J. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 71, p. 1891-1895, 2009.

ZERROUK, N.; GINÈS DORADO, J.M.; ARNAUD, P.; CHEMTOB, C.; Physical characteristics of inclusion compounds of 5-ASA in α and β cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**. v.171, p.19-29, 1998.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-B-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutic**. v. 291, p. 3-10, 2005.

Publicação científica

Título: *IN VITRO* DEVELOPMENT AND EVALUATION OF TAMOXIFEN- β -
CYCLODEXTRIN COMPLEXES

RESUMO

O tamoxifeno apresenta baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade limitada, tornando-se um ótimo candidato a modificações tecnológicas para melhora da solubilidade. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma nova formulação do tamoxifeno, utilizando a β CD para que se encontrem melhorias na solubilidade do fármaco e consequentemente na biodisponibilidade. Neste estudo foram preparados complexos de inclusão de β -ciclodextrina e citrato de tamoxifeno desenvolvidos por diferentes metodologias os quais foram analisados por diferentes técnicas analíticas e tiveram sua solubilidade avaliada. Além disso, foram desenvolvidos comprimidos de liberação prolongada com HPMC e PEO. Os resultados obtidos no estudo de solubilidade de fases demonstraram que a melhor razão molar foi a de 1:1. A análise térmica, a microscopia eletrônica de varredura e o infravermelho demonstram que houve diferenças térmicas, morfológicas e espectrais nos complexos em relação ao fármaco puro, indicando que houve formação de complexos. A solubilidade de todos os complexos mostrou-se superior à do fármaco o que sugere à formação de complexos de inclusão. De forma geral, a incorporação do fármaco complexado na matriz polimérica demonstrou extensão na liberação do fármaco, sendo mais eficaz nas primeiras horas de dissolução, devido aos mecanismos de difusão do fármaco na matriz proporcionado pela complexação com a β CD.

Unitermos: Citrato de tamoxifeno. Teste de dissolução. Liberação de fármaco. β -ciclodextrina. Complexos de inclusão. Caracterização físico-química.

ABSTRACT

Tamoxifen has low solubility in aqueous solutions and limited bioavailability, and it is thus an excellent candidate for technological modifications to improve its solubility. Therefore, the goal of the present study was to develop a new tamoxifen formulation by using β -cyclodextrin (β CD) to improve its solubility and bioavailability. In this study, inclusion complexes of β -cyclodextrin and tamoxifen citrate were developed using different methods which were analyzed

by different analytical techniques and their solubility was evaluated. In addition, sustained-release tablets with HPMC and PEO were developed. The best results in the phase solubility analysis were obtained with a 1:1 molar ratio. Thermal analysis, scanning electron microscopy and infrared spectroscopy showed that there were thermal, morphological and spectroscopic differences between the complexes and the pure drug, which confirmed the formation of complexes. The solubility of all complexes was superior to that of the pure drug, which indicated the formation of inclusion complexes with β CD. In general, the incorporation of the complexed in the polymeric matrix produced extended release of the drug, which was more effective in the first hours of dissolution, due to facilitation of the diffusion of the drug in the matrix by β CD.

Uniterms: Citrate tamoxifen. Dissolution test. Drug delivery. β -cyclodextrin. Inclusion complexes. Physicochemical characterization.

INTRODUCTION

The majority of newly developed drugs are currently characterized by high lipophilicity, low solubility in aqueous solutions, and limited dissolution (Gribbon, 2005).

The low solubility of drugs has led to the development of a variety of alternatives with the aim of improving the absorption of existing drugs. The complexation of liposoluble drugs with cyclodextrins is an excellent strategy to improve the solubility of drugs, because cyclodextrins have outer hydroxyl groups that make them relatively hydrophilic, and a hydrophobic cavity that allows the formation of inclusion complexes with various types of molecules. These complexes alter the physical and chemical properties of the complexed molecules, resulting in systems with enhanced adaptability to inclusion in matrix polymers for sustained release (Langer, Wise, 1984; Pena, 1990; Koch, 1991; Magill, 1991).

The formation of inclusion complexes with cyclodextrins changes the physical and chemical properties of the molecules, including solubility, melting point, volatility, sublimation, and chemical reactivity. The spectroscopic and

electrochemical properties, morphology, crystallinity, as well as stability regarding processes of complex degradation, also differ between the complexes and the free form of the molecule (Montassier, Duchêne, Poelman, 1997; Ficarra *et al.*, 2000; Wong, Yuen, 2001; Singh, Sharma, Banerjee, 2002; Li *et al.*, 2005; Liu, Zhu, 2005). Moreover, complexation allows for the physical isolation of incompatible compounds and the modification of drug release kinetics via the use of different polymeric systems (Bibby, Davies, Tucker, 2000), including hydrophilic matrices of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) (Sammy, Safwat, 1994; Sangalli *et al.*, 2001; Rao, Haslam, Stella, 2001) and polyoxyethylene (PEO) (Amiel, Seville, 1996; Huang, Allen Tonelli, 1998).

Tamoxifen (TAM) is a class II drug according to the Biopharmaceutical Classification System (Who, 2005), and it has low solubility in water and high plasma membrane permeability. These characteristics cause there to be only a small amount of dissolved drug available in the small intestine for absorption, and they are the reasons that TAM has limited bioavailability. Therefore, increasing the solubility of compounds with limited solubility increases their concentration in the gastrointestinal tract (GIT) and their bioavailability (Taupitz *et al.*, 2013).

The present study aimed to develop a new TAM formulation that utilized β -CD to improve its solubility, and thus to avoid side effects caused by excessive doses of the drug in its target tissues.

We developed inclusion complexes of β -CD and tamoxifen citrate (TAMOX) using kneading, melting, coevaporation, and freeze-drying. The complexes were analyzed using techniques such as differential scanning calorimetry, thermogravimetry, scanning electron microscopy, and infrared spectroscopy. In addition, we developed sustained-release tablets containing the complexes and the pure drug with HPMC and PEO. The effects of the complexation method and of the polymer used in the tablet on the release of TAMOX from the tablet matrix were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Tamoxifen citrate was purchased from Pharma Nostra Comercial Ltd. (Rio de Janeiro, Brazil), according to the description: date of manufacture: 07/2010, expiry date: 06/2015 e bath: 10083202^a, manufactured by Polydrug/laboratories pvt Ltda/ Índia.

β -cyclodextrin was purchased from Lobonathus® according to the description: date of manufacture: 07/2008 expiry date: 07/2013 and bath: 840 757, manufactured by the pharmaceutical industry Roquette (Genay, France).

The excipients used to produce the tablets were purchased from local compounding pharmacies. Microcrystalline cellulose PH 101 was purchased from Galena (batch: 1301020302; expiry date: 18/08/2017), magnesium stearate was purchased from Fagiom (batch: A/150512#6; expiry date: 13/05/2017), and colloidal silicon dioxide (Aerosil®) was purchased from Gemini (batch: B2104L1NA2; expiry date: 04/09/2014).

Two polymers manufactured by The Dow Chemical Company were donated by Colorcon (São Paulo, Brasil): Poliox®-N60k (batch: WH1255S5M5; date of manufacture: 12/08/2010; expiry date: 10/09/2010) and Methocel®-K100LV (batch: 1H13012N21; date of manufacture: 13/08/2012; expiry date: 12/08/2017).

Phase Solubility Studies

Phase solubility studies was performed according to the method described by Higuchi and Connors (1965). Tamoxifen citrate (TAMOX) (10 mM) was added to aqueous solutions containing increasing concentrations of β -cyclodextrin (β -CD) (2–10 mM) at the following TAMOX: β -CD molar ratios: 1:0.2; 1:0.4; 1:0.6; 1:0.8; and 1:1. The solutions were placed in a rotating plate for 72 hours at 25 °C. After reaching equilibrium, the samples were filtered, adequately diluted, and the concentrations were determined by spectrophotometry (Thermo Scientific® Evolution 60, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a wavelength of 275 nm. Experiments were conducted in triplicate and the results were used to generate a phase solubility diagram. The apparent solubility constant (K_c) of the complexes was calculated using the angular coefficient of the straight line, according to the equation:

$$K_c = \text{slope} \div S_o(1 - \text{slope})$$

Where S_o is the intrinsic solubility of the drug in the absence of β -CD.

Preparation of the TAMOX: β -CD solid complexes

The TAMOX: β -CD mixtures were prepared at the optimal molar ratio based on the results of the preliminary phase solubility study.

Coevaporation

The drug and β -CD were dissolved in a solution of ethanol:water (1:1, v/v), which was protected from light and stirred with a magnetic stirrer for 7 days to reach equilibrium. The solvent was removed in a rotary evaporator (Buchi® R-3 Rotavapor), and the TAMOX: β -CD complex was dried in an oven at 45 °C for 48 hours and stored away from sunlight until analysis (Zingone, Rubessa, 2005).

Freeze-drying

Freeze-drying was performed using a water:ethanol solution (1:1, v/v) containing β -CD, to which the drug was added. The resulting solution was protected from light and stirred for 24 hours, and stored at -15 °C. On the day of the experiment, the frozen samples were freeze-dried (Lyophilizer Edwards of Brasil® Pirani 78/1) for 41 hours. The freeze-dried samples were protected from light and stored until analysis (Reddy *et al.*, 2004).

Melting

The melting method was performed by heating the drug in a water bath with glycerin until it melted. β -CD was added to the melted drug and the solution was stirred until the temperature reached 155 °C (approximately 5 minutes). The mixture was dried at room temperature, pulverized, protected from light, and stored until analysis.

Kneading

Complexation using the kneading method was achieved by adding a small amount of water to a porcelain capsule containing β -CD, which was mixed with a spatula until a homogeneous paste was formed. TAMOX was slowly added to the paste and mixed for 60 minutes. During this process, drops of water were added to maintain the consistency of the paste, which was placed in an oven at 45 °C for 48 hours, after which it was lightly ground, protected from light, and stored until analysis (Rajendrakumar, Madhusudan, Pralhad, 2005; Zingone, Rubessa, 2005).

Complex characterization

Thermal analysis of the complexes by differential scanning calorimetry (DSC)

A DSC cell (TA instrument[®] DSC Q-20) was used for the thermoanalytical characterization of the complexes. The drug, β -CD, and the complex samples were placed in closed aluminum containers and subjected to a dynamic atmosphere of N₂ (50 mL min⁻¹), and a heating ratio of 10 °C.min⁻¹, with temperature ranging between 25 and 550 °C.

Thermogravimetry (TG)

A thermal scale and a platinum container containing the sample were used to obtain the TG curves (TA instrument[®] TGA Q-50). The samples were subjected to a dynamic atmosphere of N₂ (60 mL min⁻¹), with a heating ratio of 10 °C min⁻¹, at a temperature ranging from 25 to 900 °C. The respective derivatives (DTG) were obtained from the TG curves.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Complex formation and the complexation model were analyzed by comparing the spectra of the obtained products with the spectra of TAMOX and β -CD. The samples were analyzed using a Perkin-Elmer[®] spectrometer, model Spectrum 100, by attenuated total reflection (ATR) in the 4000–600 cm⁻¹ range.

Scanning electron microscopy

Qualitative and quantitative analysis of the size and morphology of the TAMOX and β -CD particles was performed by scanning electron microscopy (JEOL model JSM-6380LV). The samples were fixed on a brass stub with double-sided adhesive carbon tape and sputtered with a thin layer of gold using a sputter coater (Denton Vacuum, model Desk III) to improve conductivity.

Complex solubility study

The solubility of the TAMOX- β -CD complexes was compared with that of pure TAMOX. Dissolution performance testing was performed using a Logen Scientific[®] dissolutor. The dissolution media was degassed with distilled water at 37 °C, and gelatin capsules containing 20 mg of TAMOX were added. The solutions were stirred at 100 rpm. Aliquots of 10 mL were taken at various time points from 15 to 180 minutes of stirring and analyzed in a spectrophotometer at 275 nm. The removed sample was replaced with an equal amount of the dissolution solvent, and the corrected cumulative amount of dissolved drug was calculated. The dissolution experiments were conducted in triplicate and the release profiles were evaluated in terms of dissolution efficiency (DE), percentage of drug released after 15 (Q_{15}) and 60 minutes (Q_{60}), and $t_{50\%}$ (time required for 50% of TAMOX to be dissolved).

Production of sustained-release tablets

The tablets were produced by direct compression, using 20 mg tamoxifen citrate per tablet.

The choice of excipients used in the production of the tablets by direct compression was based on the reports of Vijay *et al.* (2012), Li *et al.* (2013), and Jalali *et al.* (2013), in consideration of the compatibility of the filling materials and the polymers used.

Ten formulations of matrix tablets containing the free drug and the complexes with β -CD were produced. Two distinct formulations were prepared for each complex and the pure drug: an HPMC-K100LV formulation and PEO-N60K formulation.

The tablets were prepared at a weight of 250 mg, with a variation of 5%, as recommended in the Brazilian Pharmacopeia (2010). The formulations are summarized in Table I.

TABLE I- Components of the formulations containing the complexes and the pure drug.

Formulation	Quantity in powder	Components (mg)				
		HPMC K100LV	PEO N60K	Mg Stearate*	CMC**	Aerosil***
T-HPMC ¹	20	75	-	2.5	151.3	1.25
K-HPMC ²	50.2	75	-	2.5	121.1	1.25
F-HPMC ³	47	75	-	2.5	124.3	1.25
C-HPMC ⁴	48.3	75	-	2.5	123	1.25
FD-HPMC ⁵	49.1	75	-	2.5	122.2	1.25
T-PEO ⁶	20	-	75	2.5	151.3	1.25
K-PEO ⁷	50.2	-	75	2.5	121.1	1.25
F-PEO ⁸	47	-	75	2.5	124.3	1.25
C-PEO ⁹	48.3	-	75	2.5	123	1.25
FD-PEO ¹⁰	49.1	-	75	2.5	122.3	1.25

*Magnesium stearate; **cellulose microcrystalline pH 101; ***colloidal silicon dioxide.
¹Tamoxifen citrate formulated with HPMC; ²kneading complex formulated with HPMC; ³melting complex formulated with HPMC; ⁴coevaporation complex formulated with HPMC; ⁵freeze-dry complex formulated with HPMC; ⁶Tamoxifen citrate formulated with PEO; ⁷kneading complex formulated with PEO; ⁸melting complex formulated with PEO; ⁹coevaporation complex formulated with PEO; ¹⁰freeze-dry complex formulated with PEO.

***In vitro* analysis of the dissolution of the sustained-release tablets**

The various solubility profiles of TAMOX were analyzed when it was incorporated into the hydrophilic HPMC and PEO matrices in matrix tablets. The effects of the complexation method and of the used polymer were evaluated using the appropriate mathematical and statistical models.

Dissolution analysis was performed using a dissolutor device (Logen Scientific®). The dissolution media was degassed distilled water at 37 °C, into which the tablets containing 20 mg of TAMOX were added. The solutions were stirred at 100 rpm. Aliquots of 10 mL were taken at various time points from 15 and 720 minutes of stirring and analyzed by spectrophotometry at 275 nm. The removed sample was replaced with an equal amount of dissolution solvent, and the corrected cumulative amount of dissolved drug was calculated. The dissolution experiments were performed in triplicate and the release profiles were evaluated with regard to dissolution efficiency (DE), percentage of drug released at 60 (Q_{60}) and 480 minutes, and $t_{50\%}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Phase solubility studies

The solubility of the cyclodextrins (CDs) was assessed using the phase solubility analysis method described by Higuchi and Connors (1965). The phase solubility diagram, which was performed at 25 °C, was plotted as a function of the β -CD concentration necessary for greater solubility of the drug in the media, as shown in Figure 1. A linear increase in TAMOX solubility was observed as the β -CD concentration increased ($R^2 = 0.99461$). In addition, the angular coefficient of the straight line was 0.45, which indicated the formation of an AL-type diagram, in which only 1 molecule of β -CD was necessary for complexation, forming a complex with stoichiometry of 1:1 (Uekama, Hirayama, Irie, 1998; Higuchi, Connors, 1965). The solubility of TAMOX was increased 98-fold when β -CD was used at a concentration of 10 mM, and the apparent equilibrium constant of the TAMOX- β CD complex was $1.38 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, which is in line with the study by Stella and He (2008), which indicated a variation in the

value of K_c between $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and greater than $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. This result predicts the strength of the formed complex.

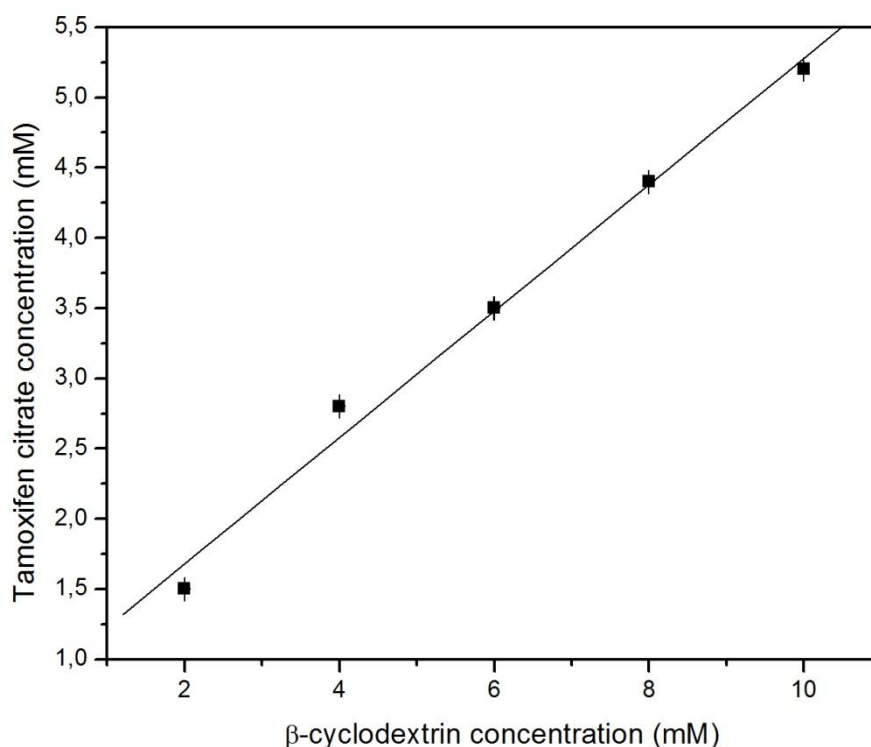


FIGURE 1- Phase solubility diagram of tamoxifen citrate in the presence of increasing concentrations of β -cyclodextrin at 25 °C.

Thermal analysis

Thermal analysis techniques were used to compare the drug complexes with the pure drug. Changes in the crystalline characteristics of materials occur when their molecules are complexed with CDs, such as changes in melting point, which may indicate complexation with β -CD; this phenomenon can be visualized by thermo analytical techniques such as DSC and TG.

The DSC curve of TAMOX (Figure 2a) shows a major endothermic event characteristic of the crystalline material ($T_{onset_{melting}} = 147 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\Delta H_{melting} = 79.18 \text{ J g}^{-1}$), which corresponds to the melting point of the drug, thus confirming

the literature (The Merck, 2001). The second endothermic event, which varies between 156 and 194 °C, and the third event, with an interval between 194 and 260 °C, are attributed to the degradation of the material, because they are associated with the TG/DTG curves by the loss of mass in this interval.

The DSC curve of β -CD (Figure 2b) shows an endothermic peak that occurs in the range between 31 and 138 °C with energy consumption of 370.2 J g⁻¹. This event is characteristic of the dehydration of the molecule, as shown in the TG/DTG curve. An irreversible thermal phenomenon of transition from the solid phase, called vitreous transition (T_g), occurs at 218 °C. T_g occurs in amorphous materials that, under the appropriate conditions of temperature and water content, become viscous; the material changes from a vitreous state to a more malleable state, without any structural changes (Aguilera, Del Valle, Karel, 1995). Water plays an important role in T_g, because it acts as a plasticizer, making the amorphous components more flexible. Therefore, components with a large amount of water in their chemical structure tend to initiate vitreous transition at lower temperatures (Fitzpatrick *et al.*, 2007).

DSC is an established thermal analytical technique that measures T_g via changes in the specific heat of the material caused by molecular mobility (Roos, 2003). In a study by Rodrigues *et al.* (2008), the T_g temperature for β -CD was 215 °C, as measured by DSC. Finally, the DSC curve shows an endothermic event in the 300–342 °C range that corresponds to the substance's thermal degradation event.

The DSC curve of the complexes produced by the kneading method (Figure 2c) provided data regarding thermodynamic events that were similar to those that occurred with both TAMOX and β -CD. Events associated with the dehydration of β -CD were observed in the same temperature range that produced dehydration in the pure material. There was an endothermic event at approximately 147 °C, which corresponded to the melting range of the drug, and was followed by 3 thermal degradation events, which were confirmed by TG/DTG, and also associated with the drug and β -CD. These results suggest that the kneading method may not have effectively formed inclusion complexes, because there were no thermo analytical changes.

The DSC curve of the complexes produced by the melting method (Figure 2d) showed no endothermic event at 147 °C, which was evident in the DSC curve of TAMOX because it represented the melting point of the drug. This result was a consequence of the method used to form the complex. In addition, the endothermic event that corresponded to β -CD dehydration was continuously present. Later, TAMOX degradation events were observed with $T_{\text{onset}} = 156$ °C and $\Delta H = 36.11$ J g⁻¹, in addition to β -CD degradation events, which started at 300 °C. With the melting method, the thermo analytical curves were different from those of the pure drug, which indicated that complexation occurred. This complexation was confirmed by infrared spectroscopy, as shown below.

The DSC curve of the complexes produced by the coevaporation method (Figure 2e) shows the endothermic phenomenon of β -CD dehydration. However, the formation of a new endothermic event with $T_{\text{onset, melting}} = 100$ °C and $\Delta H_{\text{melting}} = 9.253$ J g⁻¹ was observed, which suggested a different in the melting point of the drug. This result was confirmed by TG/DTG, because at this temperature there was no loss of mass associated with material degradation. Subsequently, events associated with the degradation of TAMOX and β -CD occurred.

The DSC curve of the complexes produced by the freeze-dry method (Figure 2f) shows a melting point different from the TAMOX melting point, with $T_{\text{onset, melting}} = 112$ °C and $\Delta H_{\text{melting}} = 2.177$ J g⁻¹, as confirmed by TG/DTG due to the absence of mass loss. Events associated with TAMOX and β -CD degradation also occurred.

These results showed that changes occurred in the thermal characteristics of most formed complexes in comparison with the pure drug. These changes differed between the products. The intensity of the melting point decreased with the coevaporation and freeze-dry methods, which indicated complexation with β -CD. Changes in the entropy, melting range, and enthalpy of the drug occurred with the variation in the intensity of this event.

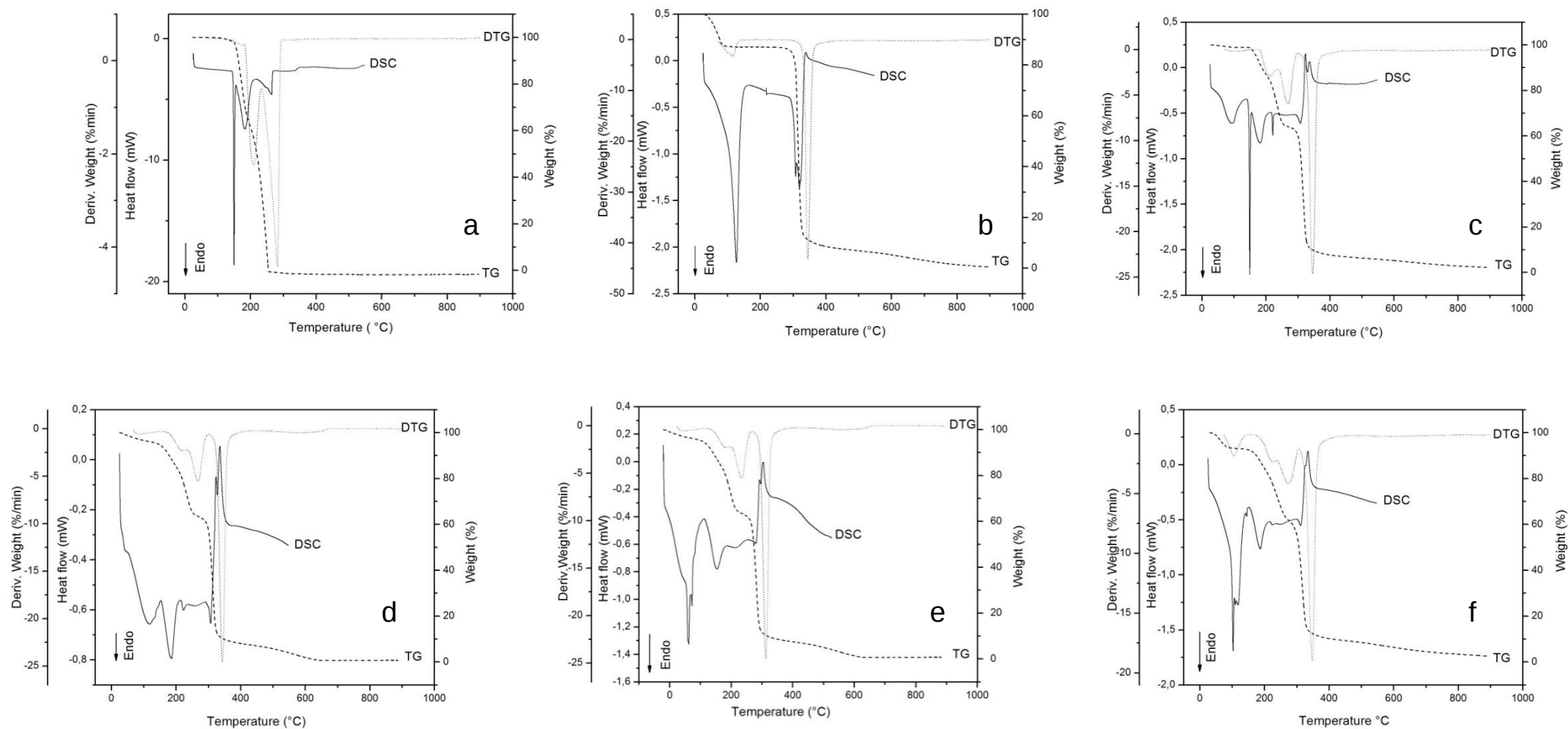


FIGURE 2- DSC and TG/DTG curves of TAMOX (a), β -CD (b), and complexes generated using the kneading (c), melting (d), coevaporation (e), and freeze-dry (f) methods in a N_2 dynamic atmosphere, with a heating ratio of $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)

Infrared spectroscopy (in the 4000–600 cm^{-1} range) was used as an analytical technique to confirm complexation.

Figure 3 shows the infrared spectra of TAMOX, β -CD, and TAMOX/ β -CD complexes formed using the kneading, melting, freeze-dry, and coevaporation methods.

The TAMOX spectrum shows bands that are characteristic of the drug in its salt form, with a peak at 1719 cm^{-1} assigned to the C=O vibration, which is characteristically a strong, stretched, and visible band, varying between 1650 and 1820 cm^{-1} . At 1596 cm^{-1} there is a weak band that corresponds to the C=C vibration, and at 3020 cm^{-1} there is a band associated with the C-H vibration of aromatic rings and alkenes.

The β -CD spectrum presents a broad band in the interval between 2900 and 3700 cm^{-1} that corresponds to the O-H vibration. Moreover, there is a broad region between 600 and 1500 cm^{-1} that exhibits a large number of peaks, which is the finger print region of the substance (Mcmurry, 2005).

As was mentioned earlier, the kneading method did not produce significant differences in thermal analysis data when compared to the isolated substances. This result was confirmed by infrared spectroscopy, in which there was an overlap of the TAMOX and β -CD spectra, with no relevant spectral differences to confirm complexation.

The infrared spectra of the melting, coevaporation and freeze-dry methods show that there were vibrational changes in the involved molecules. Figure 3 shows the absence of the spectral bands associated with the C=O bond and, most importantly, with the C=C bond, which suggests that complexation occurred in the region of the aromatic ring with its inclusion in the cavity of β -CD. Although there was more than one aromatic ring in the molecular structure of TAMOX, the stoichiometry of TAMOX: β -CD complexation appears to be 1:1. This is because of the stereochemical incompatibilities caused by the presence of a second β -CD molecule, which does not favor the formation of 1:2 complexes. This type of complexation is similar to that

observed in the study by Floare, Pirnau, and Bogdan (2013) in which they assessed the molecular region of complexation of β -CD with flufenamic acid and tolfenamic acid, which both having 2 aromatic rings. They concluded that only 1 ring was included in the cavity of β -CD at any given time.

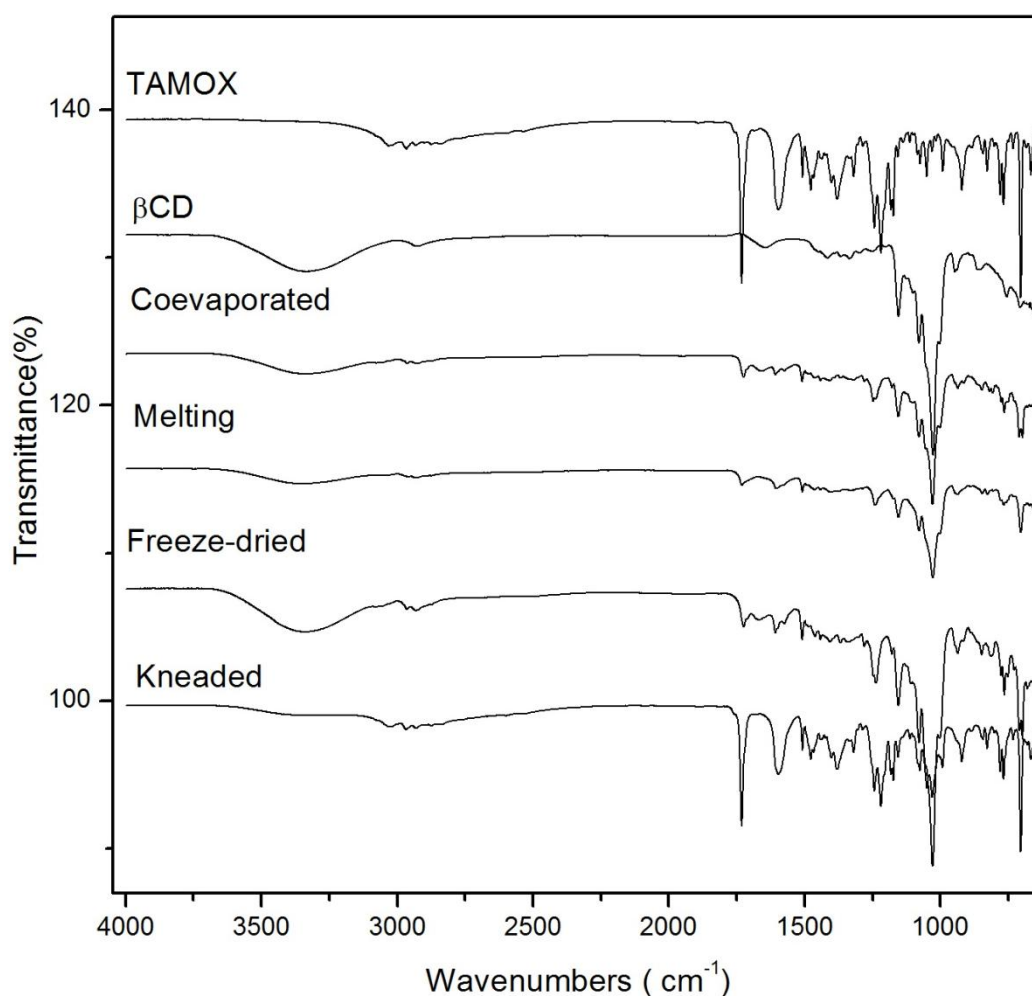


FIGURE 3- Absorption spectra in the infrared region of tamoxifen citrate, β -CD, and complexes formed by different methods.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) characterizes pharmaceutical materials, especially with regard to form, structure, and size of the particles. In addition, it allows the qualitative and quantitative assessment of morphological changes that occur in the particles of the different complexes.

TAMOX, β -CD, and all complexes developed in this study were subjected to SEM to compare the microscopic changes in the formed complexes.

Figure 4 shows the photomicrographs of the samples of the different complexes, TAMOX, and β -CD.

The analysis of the TAMOX (Figure 4a) and β CD (Figure 4b) images indicated preference for the crystalline form. The β -CD crystals are preferentially classified as monocyclic parallelograms, according to Saltão and Veiga (2001), and are larger than TAMOX, with trigonal-shaped crystals. Figure 4c shows the particles obtained with the kneading method; there is a predominance of crystals similar to TAMOX and to β CD. These data confirmed the results obtained with both thermal analysis and infrared spectroscopy, and demonstrate the combination of the 2 substances with this method.

With regard to the melting method (Figure 4d), structural changes in the crystals were observed. The size of the particles was smaller than those of TAMOX and β CD, which confirmed the complexation of the materials.

Figures 4e and 4f, depicting samples produced via the coevaporation and the freeze-dry methods respectively, show that there were changes in the structure of the crystals with both methods. In the freeze-dried complex, the crystals exhibited a disarranged structure because of the technique used to form the complex. These results suggested that a new substance was formed, and confirmed the change in the melting range of TAMOX observed in the DSC and TG/DTG curves, which was possibly due to the formation of a new crystal.

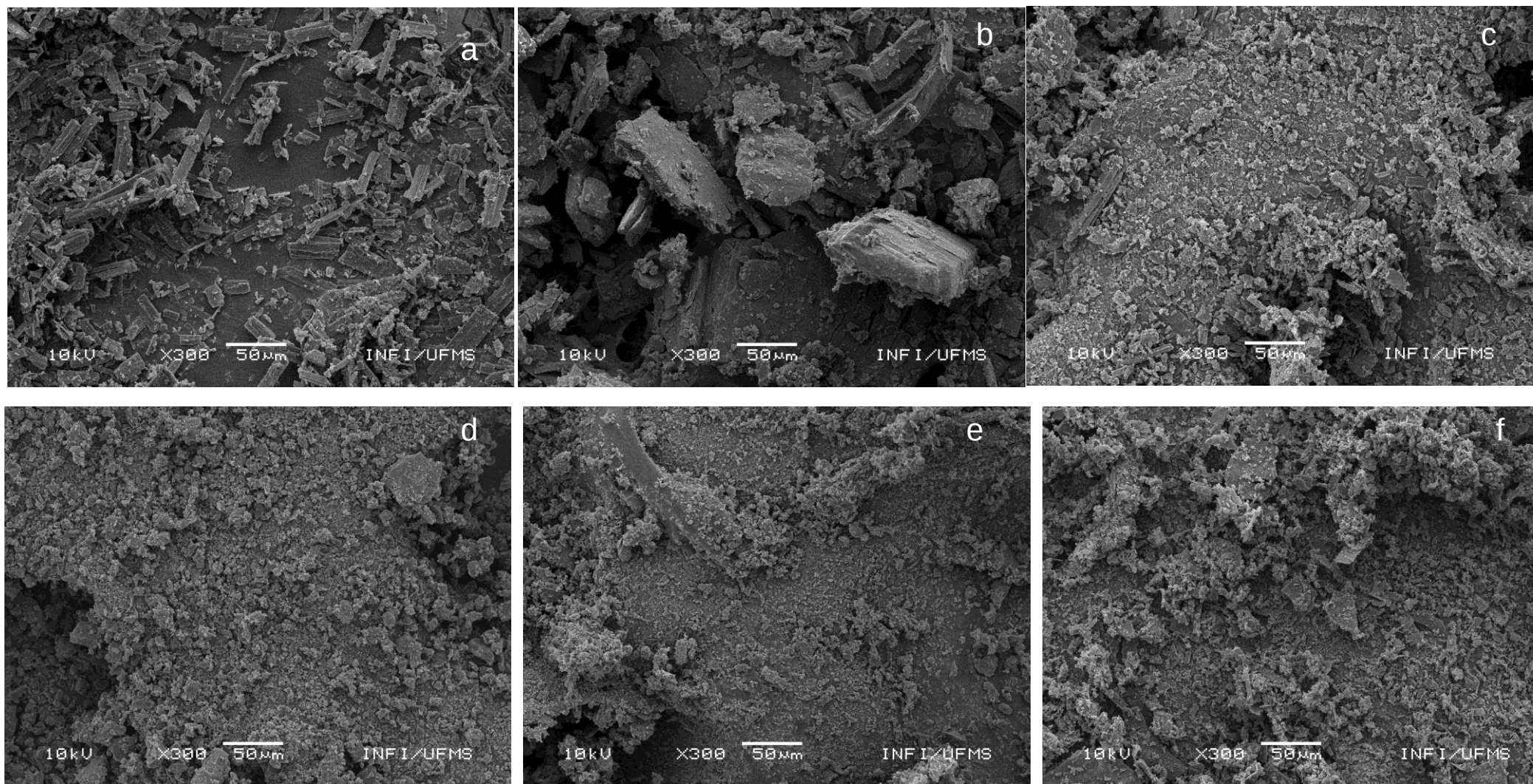


FIGURE 4- Scanning electron micrograph (300× magnification) of TAMOX (a), β CD (b), and complexes produced by kneading (c), melting (d), coevaporation (e), and freeze-dry (f).

Complex solubility analysis

The results of the analysis of complex dissolution are summarized in Table II, including dissolution efficiency (DE), amount of drug dissolved at 15 (Q_{15}) and 60 (Q_{60}) minutes, and $t_{50\%}$. The dissolution profile of the pure drug and of the various complexes was plotted according to the percentage of drug dissolved as a function of time, as shown in Figure 5.

TABLE II - Dissolution efficiency (DE)^a, percent of dissolved TAMOX at 15 (Q_{15}) and 60 min (Q_{60}), and $t_{50\%}$ ^b of TAMOX (T), kneaded (K), coevaporated (C), melted (M), and freeze-dried (FD) products.

Products	DE (%) ^a $\pm$ SD	$Q_{15}(\%) \pm$ SD	$Q_{60}(\%) \pm$ SD	$t_{50\%}$ (min)
T	31.50 $\pm$ 4.33	2.71 $\pm$ 4.52	27.40 $\pm$ 3.50	162
K	68.76 $\pm$ 0.60	59.77 $\pm$ 4.50	68.69 $\pm$ 3.27	12
C	71.53 $\pm$ 0.71	71.74 $\pm$ 2.96	74.43 $\pm$ 1.53	10
M	56.37 $\pm$ 1.42	60.45 $\pm$ 5.34	62.10 $\pm$ 3.75	23
FD	61.74 $\pm$ 3.50	49.47 $\pm$ 0.81	54.68 $\pm$ 2.47	12

^aCalculated from the area under the dissolution curve at 180 min.

^bTime required for 50% of TAMOX to be dissolved.

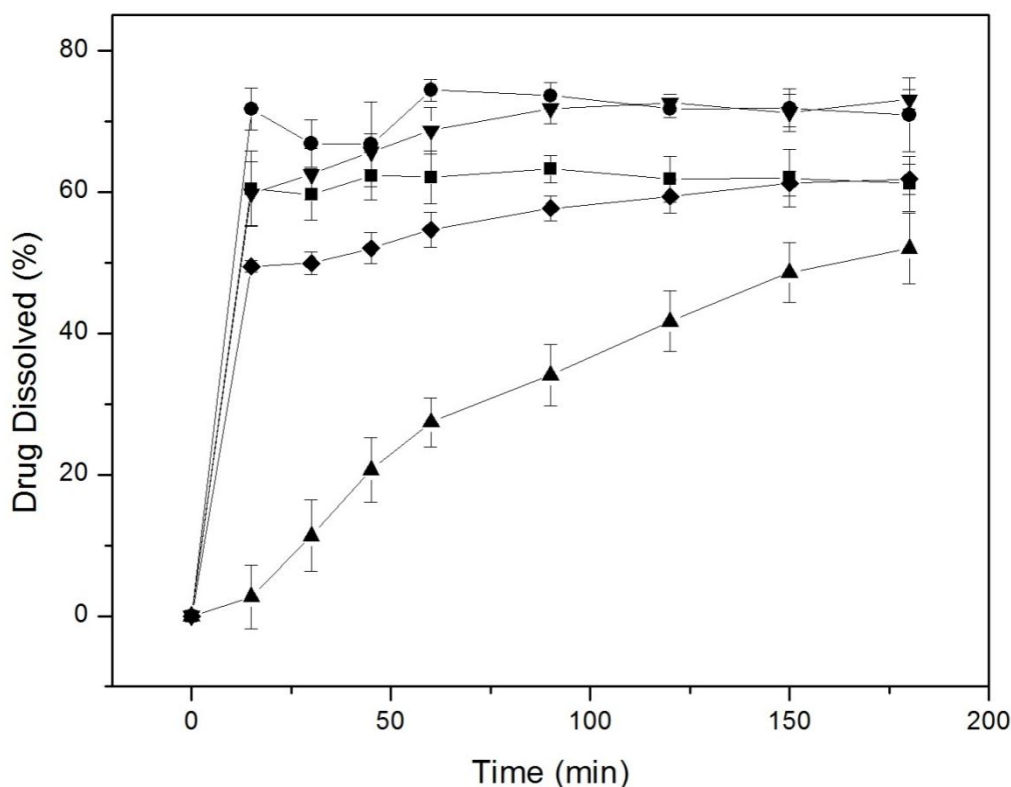


FIGURE 5- Dissolution curve of the different complexes and of the pure drug as a function of time in distilled water at 37 °C. Key: (circle) coevaporation, (inverted triangle) kneading, (square) freeze-dry, (diamond) melting, and (triangle) pure TAMOX.

Table II shows that pure TAMOX exhibited low solubility in water, with Q_{15} , Q_{60} , and DE values lower than those obtained with all of the complexation methods. The various formulated complexes exhibited a higher percentage of released drug than the pure drug, which indicated that the methods used were effective in improving the solubility of the drug.

The drug release rate for the complexes produced by the kneading method increased from ~59% at 15 minutes to ~68% at 60 minutes. This method exhibited the second best DE of the TAMOX complexes, as shown in Table II and in the dissolution graph (Figure 5). However, considering the physical and chemical characterization of this complex by thermal analysis, infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy, complexation with β -CD was made difficult by this method. Solubility improvement using this method

can be explained by the fact that it increases the wettability of the drug surface by decreasing the superficial free energy of the drug, which leads to reduced surface tension in the dissolution media, and the formation of *in situ* complexes. A similar result was observed in the study by Rodrigues et al. (2008).

The complexes produced by the melting method showed a DE of ~56%, Q_{15} of ~60%, and Q_{60} of ~62% (see Table II). As shown in Figure 5, this method produced small changes in the extension of TAMOX release in the interval between 15 and 180 minutes, and was the least effective in improving the release of the drug in aqueous solution. This result may be explained by the high stability of the crystal formed, due to the high crystallinity of the material. This results in a reduction in the free energy of the particles and in an increase in the dissolution heat of the product, whose solubility is thus decreased.

Of the described methods, the release profile of the freeze-dry method was the most constant, with a variation of 4% between the initial and final release of the drug, as shown in Figure 5. These results confirm the previously reported physical and chemical characterization tests, because they demonstrate an evident improvement in the solubility of the drug caused by complexation with β -CD.

Of the assessed profiles, the coevaporation method exhibited the highest DE, Q_{15} , and Q_{60} , as shown in Table II. This improvement in the solubility of the drug is probably characterized by the formation of a new crystal with enhanced solubility properties, as evidenced by the spectral, thermal and morphological differences between the complex and the pure drug.

***In vitro* analysis of the dissolution of the matrix formulations**

The various release profiles of the PEO and HPMC matrix formulas are shown in Figure 6 and 7, respectively, and are expressed as a percentage of dissolved drug as a function of time. The effects of the complexation method and the polymer were evaluated by measuring DE, as well as the amount of drug dissolved at 60 (Q_{60}), and 480 minutes (Q_{480}), as shown in Table III.

The dissolution profile of the matrix tablets of PEO shows the presence of 2 distinct moments in the dissolution curve. Initially, until approximately 350 minutes of dissolution, the profiles are similar to those observed in the solubility analysis of the complexes. The Q_{60} of the T-PEO formulation was the lowest of all of the formulations; the release of the drug via the PEO matrix occurs mainly by Fickian diffusion. After approximately 350 minutes, the curve is reversed and the dissolution rate of the T-PEO formulation becomes the highest among the formulations, with the exception of the F-PEO formulation, as is evidenced by the Q_{480} . This can be explained by the erosion process of the polymeric system that facilitates the release of liposoluble drugs such as TAMOX, which are not released in the aqueous dissolution media by diffusion. The fact that the melting method (F-PEO) provides extended TAMOX release with time may be explained by the high stability and crystallinity of the complex formed via this method, which hinders its release by diffusion at the beginning of the dissolution process.

The dissolution curves of the various complexes for the HPMC and PEO tablets were similar, with the exception of the improvement in TAMOX solubility with the T-HPMC formulation at the beginning of the dissolution process (Q_{60} of ~33%, higher than that of the K-HPMC and F-HPMC formulations). This result was caused by our use of a specific polymer for liposoluble drugs, K100-LV, which improved TAMOX release from the T-HPMC formulation via Fickian diffusion.

From the analysis of the dissolution curves, we inferred that drug release from the formulations containing different polymers occurs in 2 stages. Drug release from the formulations is first governed by diffusion, and later by the erosion of the polymeric system, which leads to the inversion of the dissolution curve. This result shows that the PEO and HPMC polymeric systems developed for the various complexes are more effective in extending drug release in the first hours of dissolution, as the inclusion complexes with β -CD facilitate solubility and diffusion of the drug in the matrix.

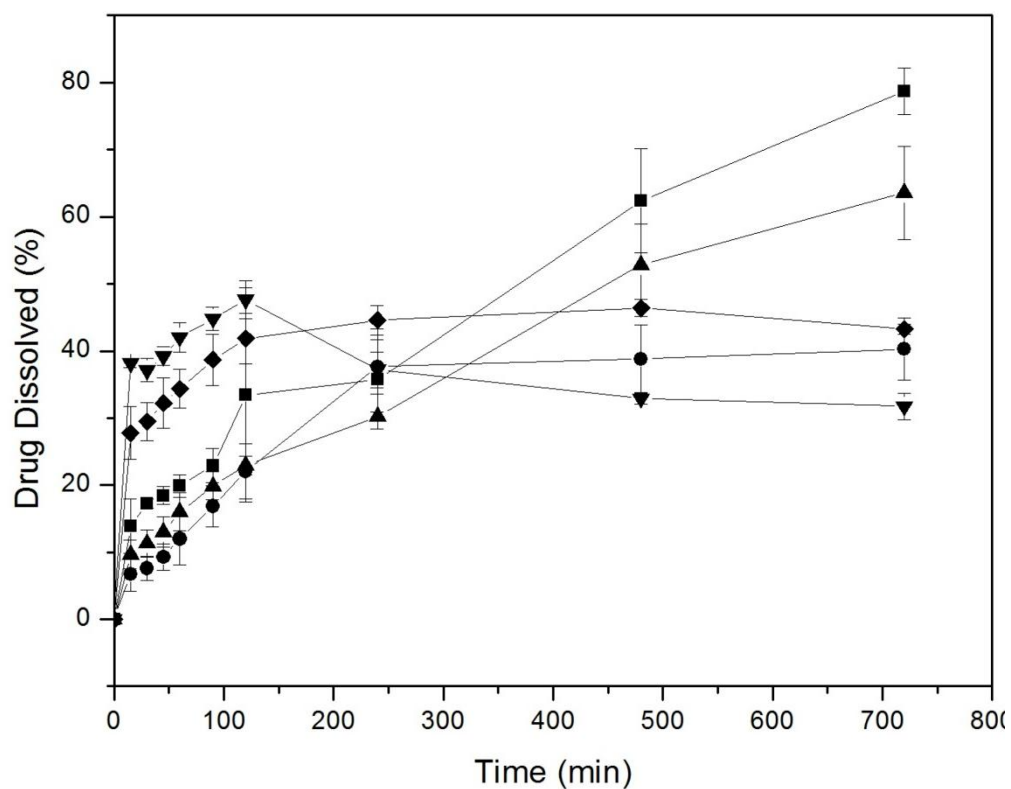


FIGURE 6- Dissolution curves of complexes and the drug alone formulated with HPMC in distilled water. Key: TAMOX (squares); kneaded (circles); melted (triangles); coevaporated (inverted triangles); freeze-dried (diamonds).

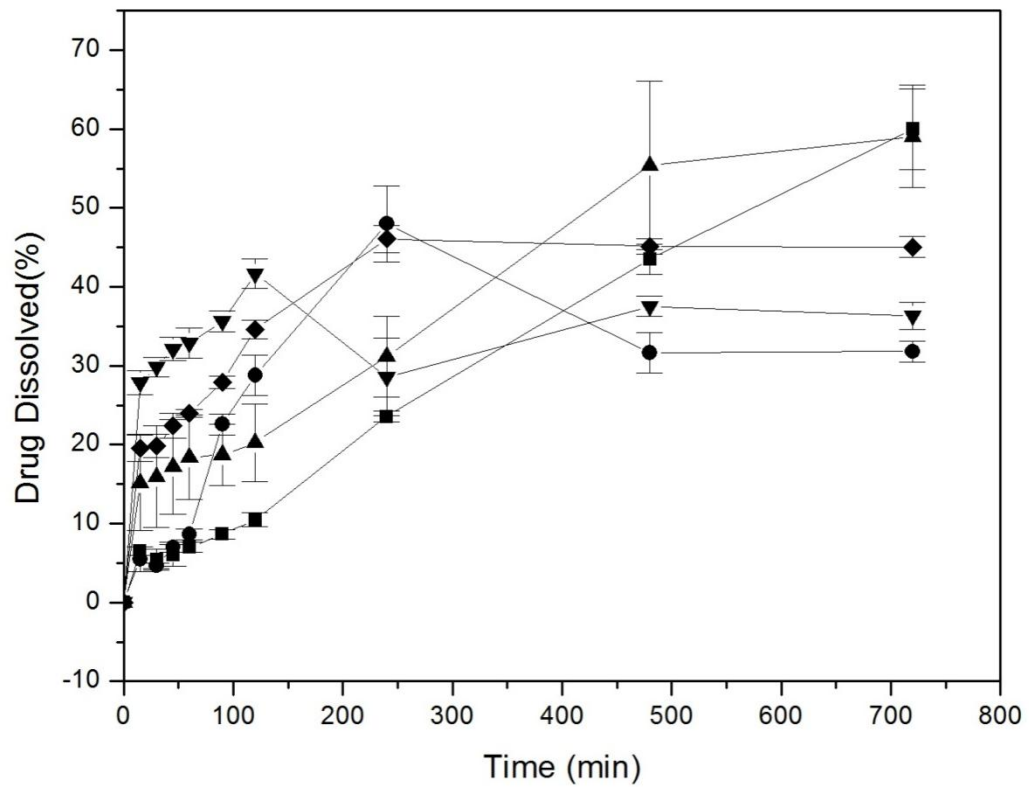


FIGURE 7- Dissolution curves of complexes and the drug alone formulated with PEO in distilled water. Key: TAMOX (squares); kneaded (circles); melted (triangles); coevaporated (inverted triangles); freeze-dried (diamonds).

TABLE III- Dissolution efficiency (DE)^a, percentage of dissolved TAMOX at 60 (Q₆₀) and 480 min (Q₄₈₀), and t_{50%}^b of matrix formulations.

Products	DE(%) ^a ± SD	Q ₆₀ (%) ± SD	Q ₄₈₀ (%) ± SD	t _{50%} (min)
T-HPMC	49.09 ± 6.07	33.44 ± 15.97	62.36 ± 7.76	362
K-HPMC	32.99 ± 1.71	22.05 ± 4.11	38.80 ± 5.10	nd*
F-HPMC	40.28 ± 3.61	22.92 ± 1.44	52.84 ± 6.04	445
C-HPMC	36.48 ± 0.30	42.03 ± 2.18	32.89 ± 0.89	nd*
FD-HPMC	43.02 ± 0.85	41.85 ± 3.73	46.41 ± 1.28	nd*
T-PEO	37.87 ± 1.08	14.36 ± 0.60	48.04 ± 1.91	574
K-PEO	32.49 ± 2.07	28.80 ± 2.52	31.66 ± 2.70	nd*
F-PEO	40.74 ± 7.14	18.42 ± 5.37	55.42 ± 10.64	427
C-PEO	34.74 ± 0.89	41.68 ± 1.84	37.53 ± 1.29	nd*
FD-PEO	41.08 ± 0.39	34.62 ± 1.20	45.13 ± 1.01	nd*

^aCalculated from the area under the dissolution curve at 720 min.

^bTime required for 50% of TAMOX to be dissolved.

*Value not identified.

CONCLUSIONS

The phase solubility study provided important information regarding the stoichiometry of the formed complexes (1:1), and the phase solubility diagram was classified as an AL type diagram. This result was confirmed by infrared spectroscopy, in which the inclusion of β-CD in the region of the aromatic ring was observed in all complexes, with the exception of those produced by the

kneading method (no significant differences were observed between their infrared spectra and that of the drug and β -CD).

The thermal analysis and scanning electron microscopy were essential to determine thermal alterations in the compounds, especially in the melting point, and structural changes in the particles of the complexes, respectively.

All of the formulated complexes improved solubility of the drug, which indicated that complexation occurred in all of the methods used for evaluation, even if only in small amounts. The analytical techniques confirmed that complexation efficiency depends on the method used. However, the complex obtained using the kneading method, which was the simplest technique used in this study, exhibited high drug solubility, which suggested the *in situ* formation of the complex.

In general, the incorporation of the complexed drug in the polymeric matrix resulted in extended drug release, which was more effective in the first hours of the dissolution process, because of the diffusion of the drug in the matrix facilitated by complexation with β -CD.

REFERENCES

AGUILERA, J.M.; DEL VALLE, J.M.; KAREL, M. Caking phenomena in amorphous food powders. Trends in Food Science and Technology, v.6, p.149–155, 1995.

AMIEL, C.; SEBILLE, B. New associating polymer systems involving water soluble β -cyclodextrin polymers. J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem., v. 25, p. 61-67, 1996.

BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. International Journal of Pharmaceutics, v. 197, p. 1-11, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. ANVISA, Brasília, v.1, 2010.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; BELLA, M.R.D.; RANERI, D.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M.L.; VILLARI, A; COPPOLINO, S. Study of the inclusion complex of atenolol with β -ciclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, p. 231-236, 2000.

FITZPATRICK, J. J.; HODNETT, M.; TWOMEY, M.; CERQUEIRA P.S.M.; O'FLYNN, J.; ROOS, Y. H. Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. *Powder Technology*, v. 178, p.119–128, 2007.

FLOARE, C.G.; PIRNAU, A.;BOGDAN, M. ^1H NMR spectroscopic characterization of inclusion complexes of tolfenami and flufenamic acids with b-cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*, v.1044 , p. 72-78, 2013.

GRIBBON, P. A. Sewing, High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS?. *Drug Discov. Today*, v.10, n.1, p.17–22, 2005.

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

HUANG, L.; ALLEN, E.; TONELLI, A.E. Study of the inclusion compounds formed between α -cyclodextrin and high molecular weight poly (ethylene oxide) and poly (ϵ -caprolactone). *Polymer*, v.39, n.20, 1998.

JALALIA, M.B.; JALAL, H.; YADOLLAH, O.; GHANBARZADEH, S.; OSKOIIB,F.M.; AGHDAMB, N.F.; ADIBKIAA, K. Formulation and Evaluation of Sustained Release Dosage Form of Nifedipine Hydrochloride Using Hydrophilic Polymers. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n.1, p. 32-37, 2013.

KOCH, H.P. Controlled drug delivery systems. *Scientia Pharmaceutica*. v. 59, p. 85-100, 1991.

LANGER, R.S.; WISE, D.L. Medical application of controlled release. Boca Raton: CRC Press, 1984.

LI, L.; WANG, L.; SHAO, Y.; NI, R.; ZHANG, T.; MAO, S. Drug release characteristics from chitosan–alginate matrix tablets based on the theory of self-assembled film. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 450, p.197– 207, 2013.

LI, N.; ZHANG, Y.H.; XIONG, X.L.; LI, Z.G.; JIN, X.H.; WU, Y.N. Study of the physicochemical properties of trimethoprim with β -cyclodextrin in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 370-374, 2005.

LIU, L.; ZHU, S. Preparation and characterization of inclusion complexes of prazosin hydrochloride with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 40, n.1, p. 122-127, 2006.

MAGILL, M. Microencapsulation. *Cosmetics & Toiletries*, v. 3, p. 54-57, 1991.

MCMURRY, J.; Química orgânica. 6^a ed., v. 1, 2005.

MONTASSIER, P.; DUCHÊNE, D.; POELMAN, M.C. Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, p. 199-209, 1997.

PENA, M.B. Microesferas: aspectos tecnológicos y aplicaciones farmacêuticas. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 9, p. 53-64, 1990.

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

RAO, V.M.; HASLAM, J.L.; STELLA, V.J. Controlled and complete release of a model poorly water-soluble drug, prednisolone, from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets using (SBE)7M- β -cyclodextrin as a solubilizing agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, n. 7, p. 807-816, 2001.

REDDY, M.N.; REHANA, T.; RAMAKRISHNA, S.; CHOWDARY, K.P.R.; DIWAN, P.V. β -Cyclodextrin Complexes of Celecoxib: Molecular-Modeling, Characterization, and Dissolution studies. *AAPS PharmSci.*, v. 6, n. 1, artigo 7, 2004.

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S.; SCHUCKO, S.K.; SCHMÜCKER, I.C.; FORTUNATO, K.A.; DOILE, M.M. Physicochemical and dissolution studies of dexamethasone acetate- β -cyclodextrin inclusion complexes by different methods. . *AAPS PharmSci.*, v.9, n.1, p. 314-320, 2008.

ROOS, Y.R. Thermal analysis, state transitions and food quality. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.71, p.197–203, 2003.

SALTÃO,R.; VEIGA, F.; Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 1, p.1-17, 2001.

SAMMY, E.M.; SAFWAT, S.M. In vitro release of anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrin from hydrophilic gel bases. *STP Pharma. Sci.*,v. 4, p. 458-465, 1994.

SANGALLI, M.E.; ZEMA, L.; MARONI, A.; FOPPOLI, A.; GIORDANO, F.; GAZZANIGA, A. Influence of betacyclodextrin on the release of poorly soluble drugs from inert and hydrophilic heterogeneous polymeric matrices. ***Biomaterials***, v.22, p. 2647-2651, 2001.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 341-359, 2002.

TAUPITZ, T.; DRESSMAN, J.B.; BUCHANAN, C.M; KLEIN, S. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: Itraconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p.378–387, 2013.

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

VIJAY, J.; SAHADEVAN, J.T.; PRABHAKARAN, R.; MEHRA, G.R. Formulation and Evaluation of Evaluation of Cephalexin Extended-release Matrix Tablets Using Hydroxy Propyl Methyl Cellulose as Rate-controlling Polymer. Journal of Young Pharmacists, v.4, p. 3-12, 2012.

WHO - World Health Organization. Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for the WHO Model List of Essential Medicines immediate release, solid oral dosage forms. Geneva, 2005.

WONG, J.W.; YUEN, K.H. Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β and γ -cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics, v. 227, p. 177-185, 2001.

ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-B-cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutic, v. 291, p. 3-10, 2005.

ANEXOS

Anexo I

Determinação do teor dos complexos tamoxifeno- β -ciclodextrina

Objetivo: Determinar a concentração de citrato de tamoxifeno nos complexos desenvolvidos por diferentes metodologias de forma a permitir a correção para produção das formas farmacêuticas.

Metodologia: O doseamento dos complexos foi realizado através de uma adaptação da *British Pharmacopoeia* (2009). Onde foi pesado exatamente 10 mg do complexo sendo esse diluído em 50 mL de metanol e colocado em banho de ultrassom por 10 minutos. Essa solução foi devidamente filtrada e, desprezados os primeiros 10 mL do filtrado. Desse filtrado foram retirados 2 mL de solução e esta devidamente diluída em balão de 10 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata. A curva de calibração foi construída no intervalo de 12-60 $\mu\text{g/mL}$ e aferida em 275nm.

Resultados: A curva de calibração produzida resultou em uma equação linear $y = 0,000429 + 0,01998x$ ($R^2 = 0,9999$). Os resultados para os diferentes complexos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1- Teor de tamoxifeno nos diferentes complexos

Formulação	Média $\pm$ DP TAMOX (mg)
K	3,99 $\pm$ 0,073
C	4,16 $\pm$ 0,455
M	4,25 $\pm$ 0,379
FD	4,073 $\pm$ 0,114

Anexo II

Avaliação das características físicas dos comprimidos

Objetivo: Avaliar os comprimidos produzidos quanto às suas características farmacopeicas conforme a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para tanto, procedeu-se a determinação da variação de peso, resistência ao esmagamento e a friabilidade.

Metodologia: O teste de variação de peso consistiu na pesagem de 20 comprimidos em balança analítica Shimadzu® modelo AY220. Os resultados foram expressos como a média da variação de peso entre os comprimidos.

O teste de resistência ao esmagamento consistiu na utilização de 10 comprimidos, submetidos ao aparelho de mola em espiral (Durômetro) verificando a força radial dos comprimidos medida em newtons.

Para avaliação da friabilidade foram pesados exatamente 20 comprimidos, os quais foram submetidos ao aparelho friabilômetro marca Marconi® modelo MA 791 por 4 minutos a 25 R.P.M. Ao final do tempo, os comprimidos foram pesados novamente e a diferença entre o peso inicial e o final resultou na friabilidade expressa em porcentagem (%) de perda de massa.

Resultados: Os resultados relativos às propriedades físicas dos comprimidos como o peso médio, resistência ao esmagamento e friabilidade obtidos a partir das formulações desenvolvidas estão expressos na Tabela 2.

A avaliação de tais princípios é essencial para presumir a qualidade inicial dos comprimidos produzidos, uma vez que estão frequentemente relacionados a outras variáveis, como o comportamento de dissolução.

O ensaio de peso médio permite avaliar a uniformidade de peso em um lote de produção de comprimidos, no qual apresenta-se como parâmetro inicial de avaliação de qualidade.

A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza uma variação de 5% em peso para comprimidos com massa contendo 250 mg ou mais. Os resultados obtidos indicam que todos os lotes de comprimidos se encontram dentro dos parâmetros dos limites especificados.

A resistência mecânica dos comprimidos foi avaliada pelo teste de dureza e friabilidade os quais visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).

O teste de dureza permite determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial o que o torna proporcional à força de compressão. O valor mínimo aceitável de dureza é de 3 Kgf, quando utilizado equipamento de mola espiral, demonstrando conformidade de todas as formulações neste teste.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) a friabilidade é a medida da resistência dos comprimidos à abrasão, aceitando valores inferiores a 1,5% de perda total de massa dos comprimidos submetidos à aparelhagem especializada. A formulação liofilizada quando comprimida com HPMC demonstrou baixas características de compressibilidade dado a porosidade elevada das duas substâncias, o que levou à friabilidade deficiente nessa formulação, não estando em conformidade com os parâmetros mínimos de qualidade.

Tabela 2- Propriedades físico- químicas dos comprimidos de HPMC e PEO.

Formulação com HPMC	Peso médio (mg)*	Dureza (KgF)**	Friabilidade (%)*	Formulação com PEO	Peso médio (mg)*	Dureza (KgF) **	Friabilidade (%)*
Tamoxifeno	236,7 (3,8) ^a (1,6) ^b	7,7 (1,2) ^b	0,16	Tamoxifeno	249,0 (7,9) ^a (3,2) ^b	8,4 (1,6) ^b	0,2
Pasta	251,7 (5,4) (2,1)	11,9 (2,9)	0,1	Pasta	246,5 (6,2) (2,5)	8,2 (4,0)	0,39
Fusão	254,0 (4,8) (1,9)	5,2 (1,8)	0,61	Fusão	251,5 (6,4) (2,5)	7,4 (3,5)	0,1
Coevaporação	252,4 (4,0) (1,6)	11,0 (4,6)	0,16	Coevaporação	256,9 (4,1) (1,5)	5,9 (1,2)	0,15
Liofilização	258,5 (4,3) (1,7)	3,2 (0,4)	5,2	Liofilização	251,0 (5,2) (2,1)	7,3 (1,7)	0,1

* n = 20; ** n = 10. ^a Desvio Padrão (mg); ^b Coeficiente de Variação (%).

Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de TAMOX nos comprimidos

Objetivo: Validar uma metodologia por CLAE para determinar o teor de TAMOX nos comprimidos preparados por diferentes metodologias.

Metodologia: A validação da metodologia analítica para determinação do teor de citrato de tamoxifeno em formulação farmacêutica foi baseada no compêndio internacional de validação de métodos analíticos *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005) através da determinação dos parâmetros: linearidade, exatidão, precisão e robustez.

a) Condições cromatográficas

O método cromatográfico para quantificação de tamoxifeno em comprimidos foi desenvolvido em cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex® Ultimate 3000 equipado com detector de rearranjo de diodos (DAD) operado com *software* Chromeleon® 7.1. As condições cromatográficas experimentais foram realizadas em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), utilizando coluna Kinetex C18 da marca Phenomenex® contendo as seguintes especificações: 100 Å, 150x2,1 mm, com tamanho de partícula de 2,6 µm. A fase móvel foi composta de acetonitrila: água ácida (pH=3) ajustada com ácido orto-fosfórico. A proporção dos constituintes da fase móvel foi 80:20 v/v (acetonitrila: água pH 3) com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ operando em modo isocrático de separação. O volume de injeção foi de 20 µL e o detector de DAD foi fixado no comprimento de onda de 237nm.

a) Linearidade

A linearidade foi analisada através da preparação de uma solução estoque de 200 µg mL^{-1} na qual se preparou a solução mãe (20 µg mL^{-1}). Foram feitas sucessivas diluições obtendo cinco concentrações diferentes, no intervalo de $2-20 \text{ µg mL}^{-1}$. As leituras em CLAE foram realizadas cinco vezes para cada concentração e a média das leituras foi utilizada para preparação da curva de calibração. A equação da reta da curva de calibração foi mensurada para autenticar a linearidade do método.

b) Exatidão

Para análise da exatidão foram realizadas 9 determinações em três concentrações diferentes da curva de calibração, sendo estas: o ponto mais baixo, o ponto médio e o ponto máximo da curva de calibração.

c) Precisão

Repetibilidade (intra-dia)

Para este ensaio o procedimento utilizado foi a leitura por três vezes do ponto médio da curva de calibração realizado num mesmo dia.

Precisão intermediária (inter-dia)

A precisão intermediária foi analisada por mesma metodologia da repetibilidade, porém realizada em três dias diferentes e consecutivos. Os resultados dos ensaios de precisão foram expressos através do coeficiente de variação das análises.

d) Robustez

Para análise da robustez, pequenas variações nos parâmetros são necessárias para averiguar a estabilidade do método proposto. Foram propostas modificações no método como: variação do pH da fase móvel de $\pm 0,01$, alteração no fluxo de $\pm 0,03$ e ainda variação na proporção dos constituintes da fase móvel de $\pm 1,0$. Foi utilizado o ponto médio ($10 \mu\text{g m}^{-1}$) da curva de calibração para análise deste fator.

Resultados:

Condições cromatográficas

O método proposto apresentou condições cromatográficas ideais para a quantificação do TAMOX, pois apresentou um tempo de retenção curto de 2,25 minutos, o que se torna indispensável na indústria farmacêutica onde se tem grandes lotes de comprimidos para serem avaliados. Além disso, utilizamos solventes simples e baratos, numa proporção muito baixa, o que gera pouco impacto ambiental. O cromatograma do tamoxifeno está representado na

Figura 1 e mostra o seu tempo de retenção (rT) na corrida cromatográfica proposta. A Figura 2 demonstra o perfil na região do ultravioleta (UV) do tamoxifeno com seu pico de absorção em 237 nm.

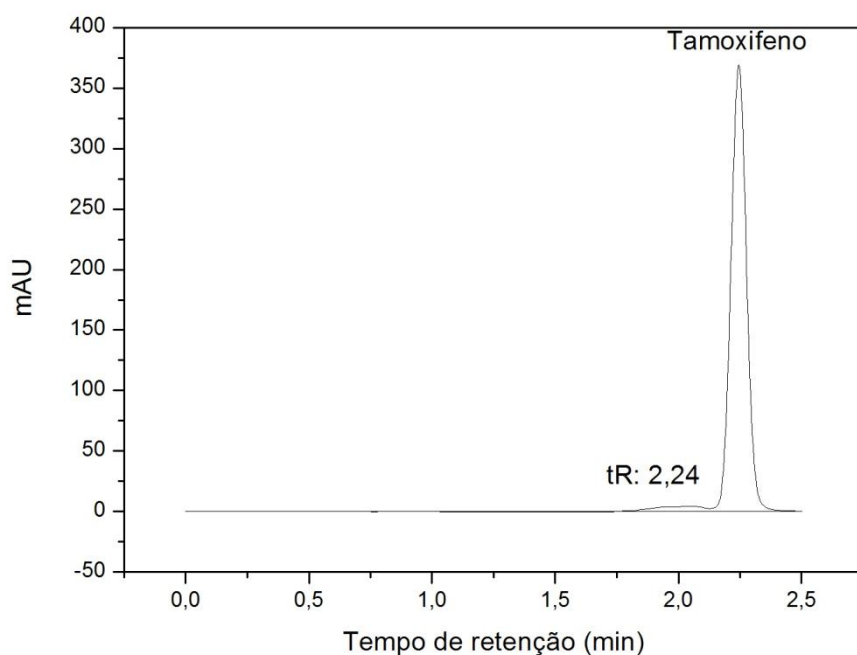


Figura 1- Cromatograma do tamoxifeno sob as condições cromatográficas: coluna Kinetex C18 (150 mm × 2,1 mm i.d., tamanho de partícula 2,6 µm); fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v) pH 3,0; vazão 0,40 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL.

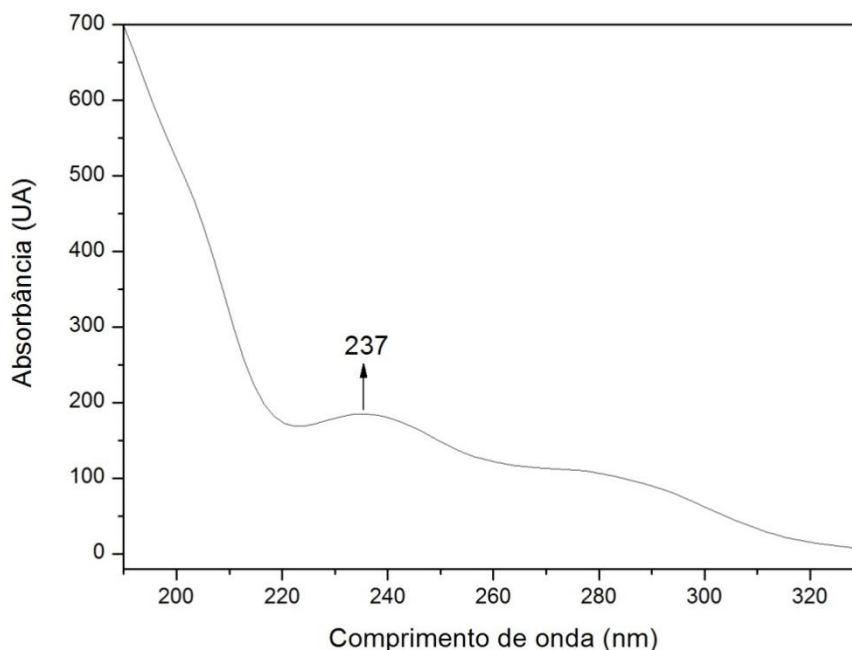


Figura 2- Espectro de absorção na região do UV da matéria-prima do citrato de tamoxifeno na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$, nas condições cromatográficas: coluna Kinetex C18 (150 mm $\times$ 2,1 mm i.d., tamanho de partícula 2,6 μm); fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v) pH 3,0; vazão $0,40\text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção 20 μL .

Linearidade

A linearidade do método traduz a correlação linear entre a concentração do fármaco e a área do pico cromatográfico, sendo determinada através da construção de uma curva de calibração que atenda a lei de Lambert e Beer. A curva de calibração construída possui as seguintes concentrações: $2\mu\text{g mL}^{-1}$, $6\mu\text{g mL}^{-1}$, $10\mu\text{g mL}^{-1}$, $14\mu\text{g mL}^{-1}$ e $20\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação (r) de 0,9996 conforme ilustrado na Figura 3. Pode-se concluir que a curva de calibração da matéria-prima do citrato de tamoxifeno demonstra um comportamento linear significativo.

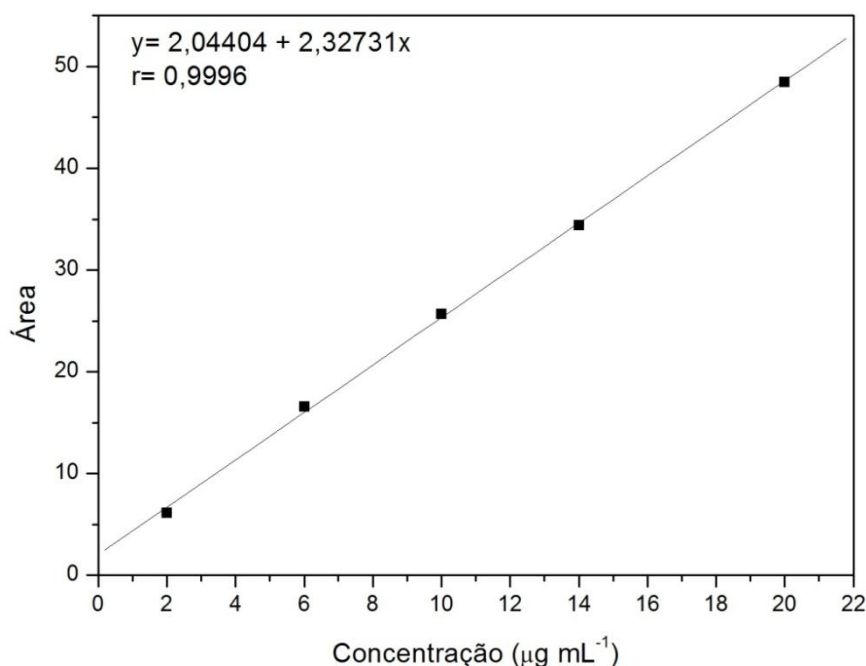


Figura 3- Curva de calibração do citrato de tamoxifeno contendo fase móvel de acetonitrila:água ácida pH=3 (80:20)

Exatidão

A exatidão analítica verifica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em se apresentar o mais próximo possível do valor teórico. Para esta análise contemplamos o ponto mais baixo ($2 \mu\text{g/mL}$), o ponto médio ($10 \mu\text{g/mL}$) e o ponto mais alto ($20 \mu\text{g/mL}$) da curva de calibração, sendo estas leituras realizadas em triplicata para cada concentração. Os valores obtidos para exatidão foram expressos em termos de porcentagem de coeficiente de variação (CV%) e estão apresentados na Tabela 3. Os resultados obtidos na exatidão estão de acordo com os limites percentuais do teor do analito, que devem estar contidos no intervalo de 80-120% da concentração teórica teste (Brasil, 2003) o que mostra a exatidão do teste.

Tabela 3- Resultados do ensaio de exatidão para o método cromatográfico proposto.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão* $\pm$ (CV%)
2,0	102,19 $\pm$ 0,40
10,0	108,47 $\pm$ 0,89
20,0	100,09 $\pm$ 0,46

* Média de três determinações

Precisão

Para análise da repetibilidade (precisão intra-dia) foram feitas três injeções em no ponto médio da curva de calibração ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão intermediária (precisão inter-dia) reflete a capacidade de um método de resistir a variações dos resultados quando analisados em um espaço de tempo maior, como em dias consecutivos. Nesse sentido, para análise da precisão intermediária foram realizados os mesmos procedimentos da repetibilidade em três dias consecutivos. Os valores obtidos para repetibilidade e precisão intermediária do citrato de tamoxifeno foram expressos em termos de porcentagem de coeficiente de variação (CV%) e estão apresentados na Tabela 4.

O coeficiente de variação encontrado para as análises de repetibilidade foi de 0,23, enquanto que para a precisão intermediária este se mostrou menor que 0,5%, garantindo assim uma adequada precisão do método, visto que a legislação (Brasil, 2003) admite valores até 5 %.

Tabela 4- Resultados do ensaio de precisão para o método cromatográfico proposto.

Amostra	Concentração teórica (µg/mL)	Precisão intermediária* ± (CV%)				Repetibilidade** ± (CV%)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3		
TAMOX	10,0	108,5±0,23	103,6±0,45	107,5±0,25	108,5±0,23	

*Média de 3 determinações realizadas em três diferentes dias. **Média de 3 determinações realizadas no mesmo dia.

Robustez

O ensaio de robustez está representado na Tabela 5 onde demonstra as modificações propostas como: alteração no pH com variações de $\pm 0,01$, na fase móvel com variação de $\pm 1,0$ na proporção acetonitrila: água ácida (80:20 v/v) e na vazão da fase móvel com variação de $\pm 0,03$. Como pode-se observar, a quantidade em teor (%) de todos os parâmetros permaneceu dentro dos limites especificados nos compêndios oficiais entre 90% e 110%

(UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009). Dessa forma, a robustez do método foi confirmada para o método proposto.

Tabela 5- Resultado do ensaio de robustez analisados através do método cromatográfico proposto.

Parâmetros Avaliados	Variações nos Parâmetros	Teor (%) [*]	Tempo de retenção (min) [*]	Nº de Pratos teóricos [*]	Assimetria [*]
pH ¹	1 ^a	95,5	2,35	5402	1,47
	0 ^b	-	2,24	5992	1,03
	-1 ^c	92,7	2,35	5369	1,46
Vazão ²	1 ^a	90,1	2,2	4325	1,48
	0 ^b	-	2,24	5992	1,03
	-1 ^c	104,1	2,54	4972	1,52
Solvente ³	1 ^a	93,1	2,35	5333	1,51
	0 ^b	-	2,24	5992	1,03
	-1 ^c	94,4	2,35	4635	1,52

^{*}Média de 3 determinações. ^a Variação superior as condições cromatográfica normais; ^b Condições cromatográficas normais: coluna Kinetex C18 (150 mm × 2,1 mm i.d., tamanho de partícula 2,6 µm); fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v) pH 3,0; vazão 0,40 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; ^c variação inferior as condições cromatográfica normais. ¹ Variação para pH 3,01 em ^a e 2,99 em ^c. ² Variação para vazão de 0,430 em ^a e 0,370 em ^b. ³ Variação na fase móvel acetonitrila:água (81:19, v/v) em ^a e acetonitrila:água (79:21, v/v) em ^b.

Anexo IV

Determinação do teor de TAMOX nos comprimidos de liberação prolongada

Objetivo: Determinar o teor de TAMOX presente nos comprimidos de liberação prolongada produzidos com HPMC e PEO.

Metodologia: A determinação do teor de TAMOX nos comprimidos foi realizada de acordo com o método previamente validado como mencionado anteriormente.

Resultados: A curva de calibração do método validado anteriormente foi utilizada para determinação do teor de TAMOX nos comprimidos. Apresentando intervalo de concentrações de 2- 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação (r) de 0,9996. Os resultados para os diferentes comprimidos estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6- Teor (%) de TAMOX nas diferentes formulações dos comprimidos de liberação prolongada.

Formulação	Teor $\pm$ DP (%)
T-HPMC ¹	103,18 $\pm$ 2,08
K-HPMC ²	97,31 $\pm$ 0,51
F-HPMC ³	97,22 $\pm$ 2,22
C-HPMC ⁴	85,00 $\pm$ 0,43
FD-HPMC ⁵	98,15 $\pm$ 0,29
T-PEO ⁶	101,29 $\pm$ 0,01
K-PEO ⁷	93,92 $\pm$ 0,15
F-PEO ⁸	98,64 $\pm$ 1,81
C-PEO ⁹	83,09 $\pm$ 2,52
FD-PEO ¹⁰	97,99 $\pm$ 2,93

Microscopia Óptica dos diferentes complexos desenvolvidos e do fármaco puro

Objetivo: Caracterizar os materiais farmacêuticos principalmente quanto à forma, estrutura e tamanho das partículas, assim como permitir avaliar qualitativamente alterações morfológicas nas partículas dos diferentes complexos.

Metodologia: Foi realizada a observação microscópica dos complexos, do TAMOX e da β CD para análise qualitativa e quantitativa do tamanho e morfologia das partículas. Para tanto foi utilizado microscópio óptico Leica®, modelo DM 5500B com sistema digital de captura de imagens.

Resultados: Foram observadas alterações estruturais nos diferentes complexos desenvolvidos, o que denota a formação de complexos de inclusão com a β CD. Estes dados não foram reportados no artigo, pois posteriormente realizamos a microscopia eletrônica de varredura que é uma técnica superior à óptica.

A microscopia óptica encontra-se ilustrada na Figura 4.

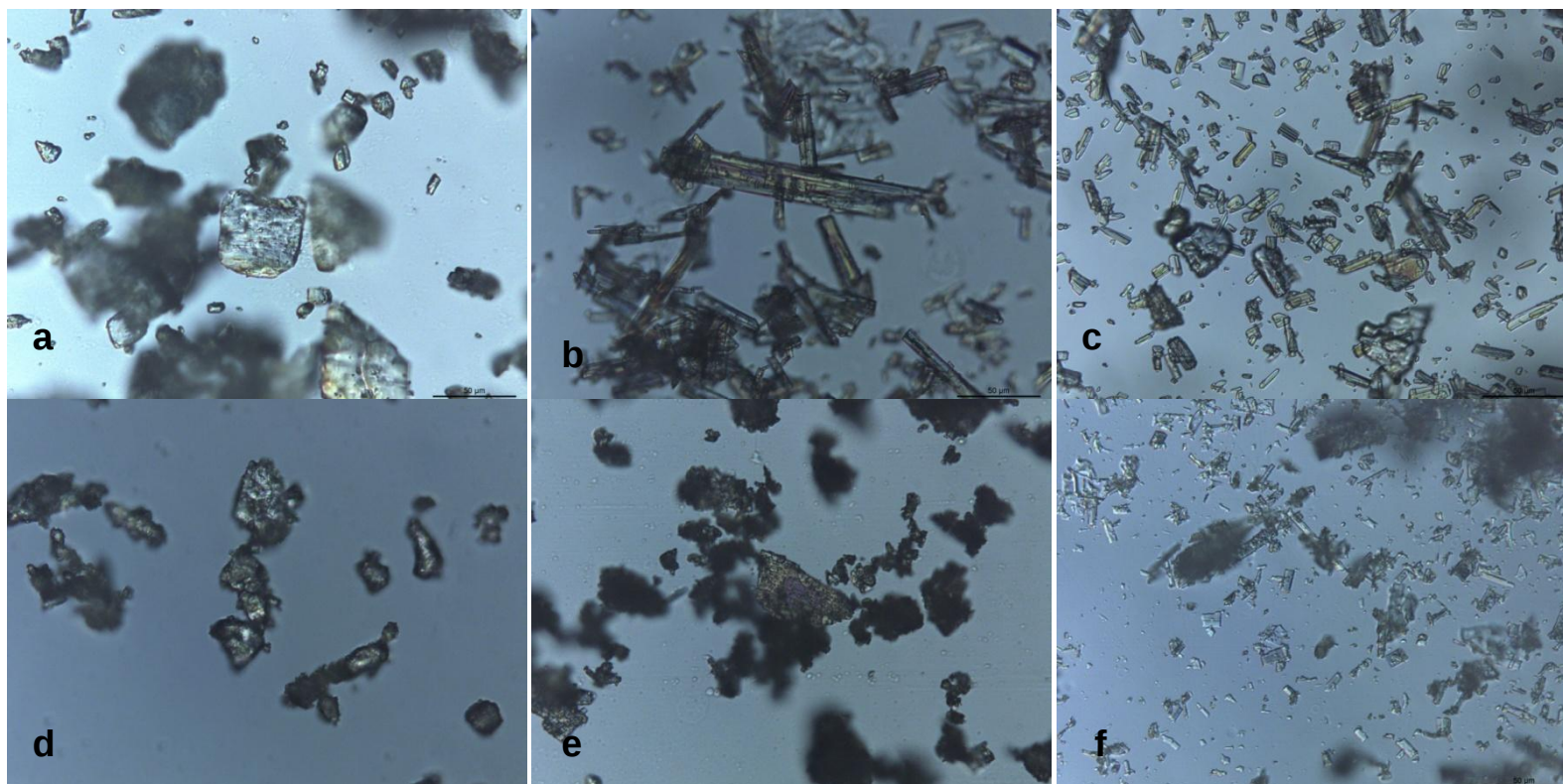


Figura 4- Microscopia óptica no aumento de 400X da β CD (a), do TAMOX (b), da pasta (c), da fusão(d), da coevaporação (e) e da liofilização (f).

Referências bibliográficas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899 de 29 maio de 2003.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. ANVISA, Brasília, v.1, 2010.

ICH Q2 (R1). International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Estados Unidos da America, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, ed. 32, v.27, n.4 , p. 2779, 2009.

Discussão geral

O desenvolvimento do presente trabalho justificou-se nas características de escassa solubilidade aquosa do tamoxifeno, devido seu elevado coeficiente de partição, o que resulta em déficit na sua absorção pelas membranas plasmáticas. Fármacos com essas características constituem grande importância na área de tecnologia farmacêutica no intuito de melhorar a sua absorção levando ao aumento na biodisponibilidade do fármaco.

Ainda assim, fármacos lipossolúveis como o tamoxifeno, não são bons candidatos à incorporação em sistemas matriciais de liberação prolongada, pois o mecanismo principal pelo qual acontece a liberação em sistemas hidrossolúveis é realizado pela difusão, o que é limitado pela alta lipossolubilidade desse fármaco incapacitando a sua liberação.

A liberação prolongada tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, pois conta com inúmeras vantagens na terapêutica do paciente, sendo considerada assim, potencial científico-tecnológico e social. Os principais polímeros utilizados em sistemas de liberação prolongada são hidrofílicos, limitando as características das moléculas incorporadas nesses sistemas. Tais polímeros polares apresentam comportamentos característicos em meios aquosos, permitindo a liberação do fármaco por diversos mecanismos, principalmente a difusão do fármaco e erosão do sistema.

O trabalho em questão foi estruturado no formato de artigo abrangendo todo o estudo realizado que fundamentou-se na produção e avaliação das propriedades físico-química dos complexos tamoxifeno- β - ciclodextrina produzidos por diferentes métodos.

Baseado nos resultados obtidos pôde-se inferir que os diferentes métodos de complexação levaram a diferentes substâncias com características espectroscópicas, térmicas, de solubilidade e estruturais distintas. Esses resultados levaram-nos a desenvolver comprimidos de liberação prolongada de HPMC e PEO para análise das características dos diferentes polímeros e do tipo de método de complexação na extensão da liberação do tamoxifeno.

Foi possível verificar na curva de dissolução dos diferentes complexos que o mecanismo de liberação das formulações com os distintos polímeros ocorrem em duas etapas, sendo inicialmente governada por mecanismo de difusão do fármaco e, posteriormente por erosão do sistema polimérico levando a uma inversão da curva de dissolução. Isto demonstra que os sistemas poliméricos de PEO e HPMC desenvolvidos para os diferentes complexos são mais eficazes na extensão da liberação do fármaco nas primeiras horas de dissolução, devido ao fato dos complexos de inclusão formados com a β CD facilitar a solubilização e o processo de difusão Fickiana do fármaco pela matriz.

Conclusões

O estudo de caracterização físico-químico dos complexos desenvolvidos, bem como do citrato de tamoxifeno e da β -ciclodextrina forneceu informações extremamente relevantes quanto à formação dos complexos.

O estudo de solubilidade de fases apresentou informações importantes quanto à estequiometria dos complexos formados (1:1) o que classificou o diagrama de solubilidade de fases como sendo do tipo AL. Este dado foi confirmado pela espectroscopia do infravermelho onde verificou-se a inclusão da β CD na região do anel aromático em todos os complexos formados com exceção ao método da pasta que não demonstrou diferenças significativas em seu espectro de infravermelho com relação ao fármaco e a β CD isolados.

A análise térmica foi de fundamental importância para analisar modificações térmicas nos compostos, principalmente no ponto de fusão. Constatou-se que nos métodos da coevaporação e da liofilização houve mudanças no ponto de fusão do fármaco o que é característico de formação de complexos de inclusão com a β CD. O método da fusão apresentou características distintas em relação aos materiais íntegros e perda do ponto de fusão provavelmente pelo método de preparação empregado. O método da pasta não apresentou significativas diferenças na análise térmica, confirmando os dados apresentados na espectroscopia do infravermelho.

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que houve modificações nas partículas dos complexos realizados pelas técnicas de coevaporação, liofilização e fusão. Sendo que o método da pasta apresentou apenas uma mistura de cristais do fármaco e da β CD.

Todos os complexos formulados apresentaram uma melhora na solubilidade do fármaco o que indica que houve complexação em todos os métodos avaliados, mesmo que em proporções menores. A eficiência da complexação é dependente do método proposto o que se confirma pelas técnicas analíticas empregadas. No entanto, o complexo pelo método da pasta, que foi a técnica mais simples empregada neste estudo, apresentou grande capacidade de solubilização do fármaco, o que sugere que houve formação de complexo *in locu*.

Os comprimidos de liberação prolongada dos diferentes complexos e do citrato de tamoxifeno foram formulados e tiveram sua qualidade avaliada através dos métodos físicos descritos nos compêndios oficiais. Esse parâmetro demonstrou falha na qualidade da formulação de HPMC contendo o complexo liofilizado quando utilizado compressão direta. Isso acontece, devido à alta porosidade dos constituintes desta formulação, o que levou a elevada friabilidade.

De forma geral, a incorporação do fármaco complexado na matriz polimérica demonstrou extensão na liberação do fármaco, sendo mais eficaz nas primeiras horas de dissolução, devido aos mecanismos de difusão do fármaco na matriz proporcionado pela complexação com a β CD.

A validação da metodologia analítica por CLAE demonstrou ser um método linear, exato, preciso e robusto, além de, possuir tempo de corrida cromatográfica de 3 minutos e consumir quantidades mínimas de solventes. Posteriormente, o método proposto será utilizado para os ensaios de doseamento e dissolução dos comprimidos de liberação prolongada.