

# 1

## Introdução

### 1.1.

#### Mecanismo da inflamação

A inflamação é uma reação do tecido vivo vascularizado a uma injúria local, ou seja, é o mecanismo de defesa (resposta protetora normal) do organismo contra uma lesão tecidual causada por agentes físicos (trauma mecânico, radiação, calor, frio), químicos (substâncias irritantes, álcalis e outros) ou biológicos, provocada por microorganismos tais como fungos, bactérias, vírus ou protozoários. No processo de inflamação, células imunologicamente competentes são acionadas e agem no sentido de inativar ou destruir microorganismos invasores, remover substâncias irritantes e proteínas antigênicas, além de iniciar a reparação tecidual. Esse processo possui quatro sinais característicos, descritos há mais de 2000 anos por CELSUS: rubor, calor, tumor e dor. Quando o processo reparatório se completa, naturalmente o processo inflamatório e seus sinais desaparecem (Zanini & Oga, 1994).

Muito embora este mecanismo de defesa seja geralmente benéfico, efeitos maléficos indesejáveis são comuns. Estes são ocasionados por uma resposta excessiva que pode causar lesão tecidual progressiva, como por exemplo, no caso das artrites, onde o processo inflamatório leva à destruição do osso e da cartilagem, comprometendo a função articular. Em tais casos, fármacos antiinflamatórios ou imunossupressivos podem ser necessários para modular o processo antiinflamatório.

O processo inflamatório caracteriza-se pela sua complexidade e dinamismo, sendo multimediado com a participação de eventos celulares e humorais interdependentes, podendo manifestar-se de forma diversa tanto no tocante à duração quanto na intensidade da resposta inflamatória, que por sua vez depende do tipo de injúria ou estímulo nocivo. Basicamente, a reação inflamatória aguda caracteriza-se por dilatação arteriolar, aumento de permeabilidade vascular, acúmulo de leucócitos e dor. Os leucócitos são atraídos ao local da lesão por mediadores inflamatórios com atividade

quimiotática<sup>1</sup>, denominados mediadores químicos. Os mediadores químicos específicos variam de acordo com o tipo de processo inflamatório. Eles podem ser aminas, como a histamina e a 5-hidroxitriptamina; lipídios, como as prostaglandinas; pequenos peptídeos, como a bradicinina, e peptídeos maiores, como a interleucina-1. A descoberta dessa ampla variedade de mediadores químicos veio esclarecer um aparente paradoxo, onde um fármaco antiinflamatório ao interferir na ação de um mediador particularmente importante em um tipo de inflamação, não afeta processos inflamatórios independentes do mediador-alvo desse fármaco.

A inflamação é desencadeada pela liberação dos mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, PAF-acéter (fator ativador de plaquetas) e enzimas lisossômicas. Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. O metabolismo do ácido araquidônico dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), ácido hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETEs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs) e ácidos epoxieicosatetraenóicos (EETs), que tem importante papel na fisiopatologia da inflamação.

A ação antiinflamatória de muitos fármacos acontece pela inibição da síntese das PGs, que são ácidos graxos insaturados contendo 20 átomos de carbono e uma estrutura cíclica incorporada<sup>2</sup>, e o entendimento da biossíntese desta substância é fundamental para a compreensão da ação desses fármacos antiinflamatórios.

As PGs e os compostos correlatos são produzidos em quantidades ínfimas em potencialmente todos os tecidos. Em geral agem diretamente nos tecidos onde são sintetizados, sendo rapidamente metabolizados a produtos inativos em seus sítios de ação. Assim, as PGs não circulam no sangue em concentrações significativas.

As PGs são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico. Este ácido é liberado dos fosfolipídeos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos.

---

<sup>1</sup> Atividade de ação atrativa ou repulsiva demonstrada por certas células vivas em relação a outras células ou substâncias que exercem uma influência química.

<sup>2</sup> Estes compostos são também denominados eicosanóides; o prefixo “eicosa” refere-se aos 20 átomos de carbono.

Pode-se observar na Figura 1, que há duas vias principais para a síntese de PGs a partir do ácido araquidônico:

- Via da cicloxigenase: As PGs, TXs e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) são obtidas através da ação catalítica das enzimas cicloxigenases. Foram identificadas duas cicloxigenases, a COX-1, que é constitutiva e amplamente distribuída e a COX-2, que é produzida em resposta a um estímulo inflamatório (Harvey *et al.*,1998).
  
- Via da lipoxigenase: As lipoxigenases podem atuar sobre o ácido araquidônico para formar 5-HPETE, 12-HPETE e 15-HPETE, que são derivados peroxidados instáveis que são convertidos em seus correspondentes derivados hidroxilados ou, na dependência do tecido, em leucotrienos ou lipoxinas (Harvey *et al.*,1998).

Nos pacientes com artrite reumatóide, é provável que a inflamação envolva a combinação de um antígeno (gamaglobulina) com um anticorpo (fator reumatóide), causando a liberação local de fatores quimiotáticos que atraem leucócitos. Os leucócitos fagocitam os complexos antígeno-anticorpo e complemento e, como consequência, liberam muitas enzimas contidas em seus lisossomos. Essas enzimas lisossômicas causam, então, danos à cartilagem e a outros tecidos, aumentando o grau da inflamação. As PGs também são liberadas durante esse processo e estão envolvidas na inflamação (Goodman & Gilman, 1987).

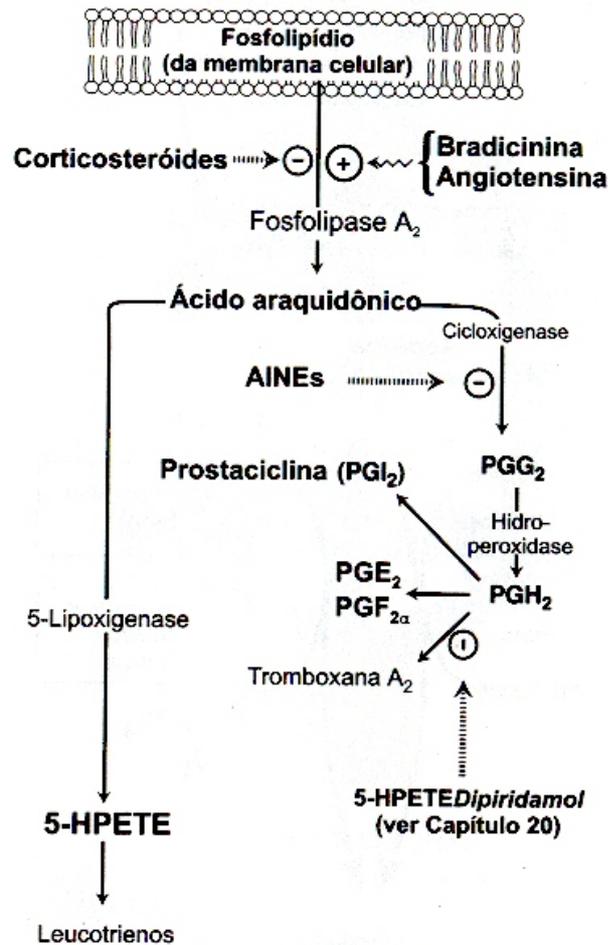


Figura 1: Esquema mostrando a síntese de prostraglandinas e leucotrienos. (Fonte: Farmacologia Ilustrada 2ª edição – Harvey *et al.*, 1998)

A migração de leucócitos para a área inflamada é um aspecto importante do processo inflamatório. No entanto é pouco provável que PGs sejam os principais envolvidos na resposta quimiotática, pois outro produto do metabolismo do ácido araquidônico, o leucotrieno B<sub>4</sub>, é uma substância quimiotática muito potente. Outra evidência desse fato é que a enzima lipoxigenase, que gera os leucotrienos, é insensível às drogas tipo aspirina; portanto, concentrações dessas drogas que suprimem a formação de PGs em geral não diminuem a migração celular (Higgs *et al.*, 1980). A ausência da migração celular costuma ser observada com a presença de maiores concentrações de PGs, mas a inibição da lipoxigenase não parece estar envolvida. Entretanto, as drogas que inibem a lipoxigenase e a cicloxigenase possuem ações antiinflamatórias superiores (Gooldman & Gilman, 1987).

As PGs estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha lesão ou inflamação. Estudos envolvendo a mensuração eletrofisiológica da descarga nervosa sensorial na presença de PGs indicaram que quando as PGs foram administradas, os receptores da dor se tornaram mais sensíveis a estímulos químicos ou mecânicos (Gooldman & Gilman, 1987).

## 1.2.

### **Antiinflamatórios não-esteroidais**

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo heterogêneo de substâncias, que em geral não estão relacionados quimicamente, e que apesar disso, tem em comum certas ações terapêuticas, como atividade antipirética<sup>3</sup>, analgésica e antiinflamatória. Isto porque atuam na biossíntese das PGs, agindo diretamente na inibição de enzimas da via cicloxigenase, mas não na via lipoxigenase. Em geral, estas substâncias apresentam propriedades ácidas com valores de  $pK_a$  entre 4 e 5.

A aspirina é o protótipo dos AINEs; é o fármaco mais usado e aquele com o qual todos os demais agentes antiinflamatórios são comparados. Entretanto, cerca de 15% dos pacientes mostram intolerância à aspirina. Desta forma fez-se necessário buscar fármacos alternativos com maior atividade antiinflamatória, menor irritação gástrica, ou ainda de ação mais longa, diminuindo a dose diária administrada. Em geral os AINEs mais novos são consideravelmente mais caros que a aspirina e alguns são comparativamente mais tóxicos (Harvey *et al.*, 1998).

De forma geral, a atividade antiinflamatória dos AINEs tem mecanismo similar ao da aspirina, sendo mediada principalmente pela inibição da síntese das PGs. Em graus variáveis, todos os AINEs são inibidores da síntese de protrombina; todos são analgésicos, antiinflamatórios e antipiréticos; todos inibem a agregação plaquetária. Todos são, também irritantes gástricos, embora componentes desse grupo tendem a causar menor irritação gástrica que a aspirina. Observa-se cada vez mais

---

<sup>3</sup> Vale lembrar que apesar do termo "antitérmico" ser amplamente difundido, a expressão "antipirético" é mais apropriada, pois estes fármacos não controlam qualquer aumento de temperatura, mas apenas o aumento patológico. Sobre a hipertermia fisiológica (aquela que pode ser detectada ao final de exercício violento, p.exemplo) estes fármacos não têm qualquer efeito.

nefrotoxicidade em associação às drogas com as quais ocorre experiência mais ampla (Katzung, 1994).

### **1.2.1.**

#### **Aspirina e outros salicilatos**

A aspirina é um ácido orgânico fraco que inativa irreversivelmente a cicloxigenase por acetilação, processo esse peculiar entre os AINEs. Os demais AINEs são também todos inibidores reversíveis da cicloxigenase. Ao que parece, os AINEs (com exceção dos mais modernos como o celecoxibe) não são seletivos sobre uma ou outra isoenzima da cicloxigenase podendo inibir tanto a COX-1 quanto a COX-2.

A aspirina é rapidamente desacetilada por esterases no organismo, dando origem ao ácido salicílico, que possui os efeitos antiinflamatório, antipirético e analgésico. Esses efeitos são essencialmente consequência do bloqueio da síntese de PGs nos centros termorreguladores hipotalâmicos e em sítios-alvo periféricos. Além disso, em razão da diminuição da síntese de PGs, os salicilatos impedem também a sensibilização de receptores de dor tanto por estímulos mecânicos como químicos.

### **1.2.2.**

#### **Derivados dos ácidos propiônico**

O ibuprofeno, que foi sintetizado em 1974, foi o primeiro desta classe de agentes a estar disponível nos Estados Unidos, surgindo em seguida o naproxeno, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, fembufeno, indoprofeno, suprofeno e oxaprozin. Estes fármacos são inibidores reversíveis da cicloxigenase.

### **1.2.3.**

#### **Derivados dos ácidos indol-acéticos**

Neste grupo de fármacos está a indometacina além de outros, que atuam inibindo reversivelmente a cicloxigenase. A indometacina que é a droga mais conhecida do grupo e apresenta atividade antiinflamatória maior que a aspirina, porém é inferior aos salicilatos em relação a doses toleradas pelos pacientes com artrite reumatóide, atua também como analgésico e antipirético.

#### 1.2.4.

##### **Derivados das oxicanas**

O piroxicam é uma das mais novas drogas antiinflamatória com potencial analgésico e antipirético introduzida na prática clínica. Nas doses recomendadas, o piroxicam parece ser equivalente à aspirina, indometacina ou naproxeno no tratamento em longo prazo de artrite reumatóide ou osteoartrite. A droga é mais bem tolerada que a aspirina ou a indometacina e, portanto, parece ser equivalente aos derivados do ácido propiônico nesse aspecto. A principal vantagem do piroxicam é a sua meia-vida prolongada o que permite a administração de uma única dose diária. Os derivados das oxicanas são inibidores reversíveis da ciclooxigenase.

#### 1.2.5.

##### **Outros AINEs não-seletivos**

Os derivados dos fenamatos (ácido mefenâmico e o meclofenamato) não apresentam vantagens sobre outros AINEs como agentes antiinflamatórios. Os derivados pirazolônicos como a fenilbutazona são potentes agentes antiinflamatórios, porém seus efeitos analgésicos e antipiréticos são discretos. O diclofenaco é mais potente que a indometacina ou naproxeno. A tolmetina e nabumetona são tão potentes quanto a aspirina, porém com a vantagem de apresentar menos efeitos adversos. Já o ceterolaco tem ação similar aos outros AINEs.

### 1.2.6.

#### AINEs seletivos

Como se pode observar todos os AINEs possuem vantagens e desvantagens uns em relação aos outros (Figura 2), desta forma a escolha do fármaco aplicável a cada tratamento é uma combinação de necessidades e resposta terapêutica particular a cada paciente. Um determinado fármaco pode promover uma resposta terapêutica em um determinado paciente e não ser eficiente em outro que esteja sofrendo da mesma moléstia.

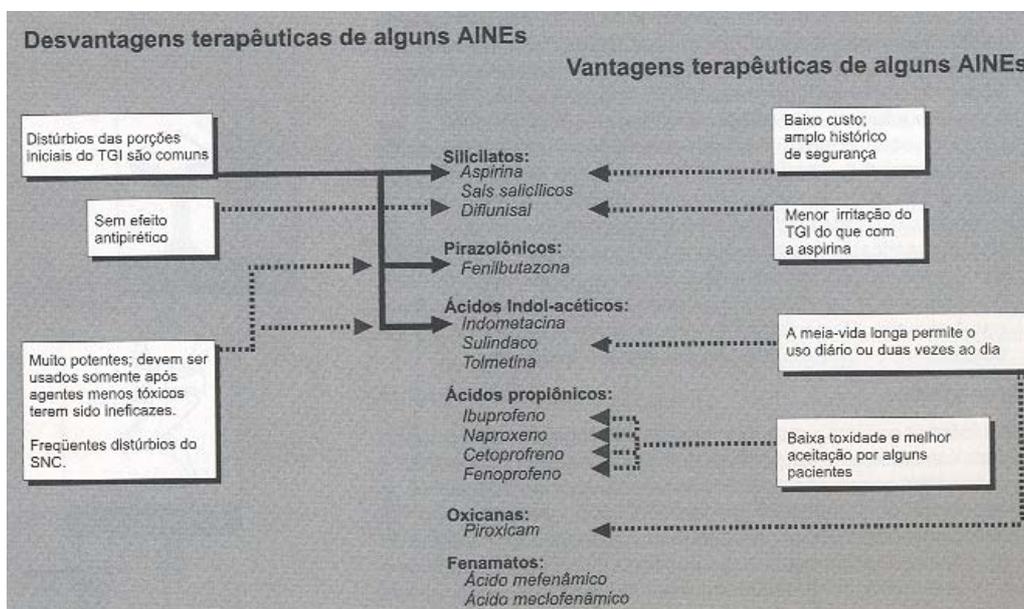


Figura 2: Vantagens e desvantagens dos AINEs. (Adaptado de Harvey *et al.*, 1998)

Pesquisas mais recentes levaram ao desenvolvimento de um grupo de fármacos antiinflamatórios seletivos. Como já foi dito, as ciclooxigenases (COXs) são enzimas que catalisam o primeiro estágio da biossíntese das prostaglandinas provenientes do ácido araquidônico. Os AINEs inibem de forma não seletiva a formação das duas isoformas da COXs, em teoria a inibição seletiva da COX-2 poderia trazer vantagens, pois esta isoforma estaria confinada aos tecidos inflamados. Desta forma, novos AINEs vem sendo desenvolvidos como por exemplo o celecoxibe (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzenesulfonamide) (Bräutigam *et al.*, 2001; Schönberger *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2002), e outros de sua família, que são inibidores da COX-2. Estes fármacos estão sendo amplamente utilizado em tratamentos de

osteoartrites e artrite reumatóide. Dados clínicos mostram também uma maior tolerância gástrica quando comparados aos AINEs não-seletivos.

### 1.3.

#### **Antiinflamatórios esteroidais - Corticosteróides**

Os corticosteróides são substâncias endógenas que estão quimicamente classificadas como esteróides, e são originalmente identificados no córtex da glândula adrenal. A glândula adrenal na verdade consiste em duas pequenas glândulas dispostas acima dos rins. A porção externa da glândula adrenal, o córtex adrenal, é essencial para a vida. Sua origem embriológica é completamente diferente daquela da medula adrenal. O córtex adrenal produz vários hormônios potentes, todos derivados esteróides possuindo o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno característico.

Estes hormônios esteróides são agrupados em 3 classes gerais, cada uma com funções características:

- (1) Os glicocorticóides, que atuam primariamente no metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídeos.
- (2) Os mineralocorticóides, que atuam primariamente no transporte de eletrólitos e na distribuição de água nos tecidos.
- (3) Os androgênios ou estrogênios, que atuam primariamente sobre as características sexuais secundárias em seus órgãos alvos específicos.

No ser humano, o principal glicocorticóide é o cortisol (ou hidrocortisona), enquanto o mineralocorticóide mais importante é a aldosterona.

### 1.3.1.

#### **Ação antiinflamatória**

Os glicocorticóides têm a capacidade de modificar o processo inflamatório dos tecidos que ao serem agredidos apresentam um extravasamento de fluidos intracelulares para o espaço peri-tecidual; em seguida a área é invadida por leucócitos e se inicia o processo de cicatrização com a formação de coágulo. As doses farmacológicas de cortisol e seus análogos têm a propriedade de limitar esse processo, sendo que esses efeitos levam a encobrir processos infecciosos em pacientes que fazem uso dessas substâncias por longo tempo. No entanto, tira-se vantagem desse mesmo mecanismo no tratamento da artrite reumatóide, como foi demonstrado por HENCHI & KENDAL em 1949 (Zanini, 1994).

Essa propriedade terapêutica de reduzir dramaticamente a resposta inflamatória e suprimir a imunidade é a mais importante dos glicocorticóides. O mecanismo exato é complexo e não totalmente compreendido. Entretanto, sabe-se que a diminuição e a inibição dos linfócitos e macrófagos periféricos têm participação no processo. Há também evidências substanciais de que os glicocorticóides induzem a síntese de uma proteína que inibe a fosfolipase A (devido à elevação esteróide-dependente da lipolicortina) e, portanto, diminui a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídios (como mostrado na Figura 1), o que diminui a formação de PGs, leucotrienos e compostos correlatos, que tem papel importante na quimiotaxia<sup>4</sup> e na inflamação.

Em termos clínicos, a administração de corticosteróides pelos seus efeitos antiinflamatório é uma terapia paliativa, pois a causa subjacente da doença permanece e as manifestações antiinflamatórias são meramente suprimidas. Essa supressão da inflamação e suas conseqüências tornaram os corticosteróides agentes terapêuticos valiosos e, de fato, às vezes salvadores. Porém é também esta propriedade que lhes dá um potencial quase único de desastre terapêutico. Os sinais e sintomas da inflamação são expressões do processo patológico que indica o diagnóstico e permite uma avaliação da eficácia do tratamento. Eles podem estar ausentes em pacientes tratados com glicocorticóides. Esta situação foi resumida no cruel e jocoso dito de que os corticosteróides, quando mal empregados, fazem com que o paciente vá andando para a sala de autópsia! (Gooldman & Gilman, 1987).

---

<sup>4</sup> Ação atrativa ou repulsiva demonstrada por certas células vivas.

Os glicocorticóides são utilizados também no tratamento dos sintomas das reações alérgicas a fármacos, soro e transfusões, da asma brônquica e da rinite alérgica. Entretanto, estes fármacos não são curativos, um exemplo é o uso do dipropionato de beclometasona e a triancinolona que são aplicados topicamente na mucosa do trato respiratório superior por inalação reduzindo os efeitos sistêmicos da doença.(Harvey *et al.*, 1998).

### 1.3.2.

#### A química dos glicocorticóides

Todos os hormônios esteróides têm um anel ciclopentanoperidrofenantreno como seu núcleo químico. Este anel de 4 membros, e seu sistema convencional de numeração são ilustrados na estrutura do cortisol ou hidrocortisona (Figura 3).

A maioria dos esteróides naturais contém cadeias laterais alcoólicas e, por esta razão, são indicados como esteróis. É possível ainda uma grande variedade de formas isoméricas dos esteróides: a união dos anéis A e B pode ter uma configuração trans ou cis. Já os estrogênios não apresentam esta forma de isomeria porque seu anel A é aromático. Hidrogênios ou outros grupos podem estar ligados aos anéis com uma orientação acima ( $\beta$ -) ou abaixo ( $\alpha$ -) do plano do anel.

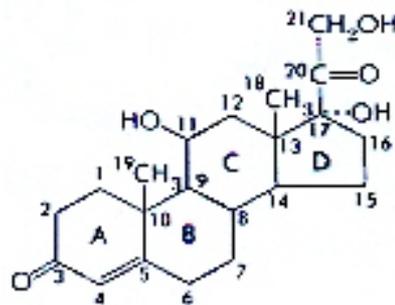


Figura 3: Estrutura molecular da hidrocortisona (cortisol).

Cerca de 50 esteróides cristalinos foram isolados da adrenal, mas apenas oito, ao que se sabe, possuem atividade fisiológica. Os mais importantes são: cortisona, hidrocortisona (cortisol, 17-hidroxicorticosterona), aldosterona, e os dois androgênios, androstenediona (androst-4-ene-3,17-diona) e desidroepiandrosterona. O cortisol é o principal hormônio adrenocortical livre circulante no plasma humano. O nível normal de cortisol no plasma é de  $12 \mu\text{g dL}^{-1}$ . Os demais hormônios esteróides encontram-se no plasma humano em concentrações relativamente pequenas (Harper *et al.*, 1982).

Estruturalmente, glicocorticóides apresentam grupos polares, hidroxilas ou cetonas conjugadas, na posição 3 (anel A) e uma cadeia lateral hidroxicetônica na posição 17 (anel D). Grupos cetona ou hidroxila são também comuns na posição 11 (anel C). Alguns glicocorticóides sintéticos apresentam substituições na posição 16, como a dexamentasona (R = OH) e a triancinolona (R = CH<sub>3</sub>). O metabolismo de glicocorticóides envolve, normalmente, a hidroxilação da posição 6, como no 6-hidroxicortisol e a redução dos grupamentos cetona presentes na posição 3, como no tetraidrocortisol e na tetraidrocortisona.

### 1.3.3.

#### **Glicocorticóides sintéticos**

Devido ao extenso uso dos corticosteróides no tratamento de doenças inflamatórias e alérgicas, muitas pesquisas foram desenvolvidas na tentativa de sintetizar derivados que apresentassem aumento das propriedades terapêuticas, ação mais específica, limitações dos efeitos adversos e maior potência. As modificações na molécula podem resultar em (i) uma afinidade aumentada do análogo de esteróides para a proteína receptora no citosol, (ii) no aumento da capacidade do complexo esteróide-receptor para agir a nível nuclear, e (iii) na degradação mais lenta no organismo. De um modo geral, as modificações de estrutura da hidrocortisona levaram a aumentos na proporção entre potência antiinflamatória e retentora de sódio, de tal modo que, em vários dos derivados atualmente disponíveis, os efeitos eletrolíticos adversos não têm conseqüências sérias, mesmo quando estes derivados são administrados em doses mais altas. As alterações na estrutura molecular podem modificar o potencial biológico, como resultado de alterações na absorção, na ligação protéica, na taxa de transformação

metabólica, na taxa de excreção, na capacidade de atravessar membranas e na eficácia intrínseca da molécula em seu local de ação.

No entanto estas modificações estruturais da molécula esteróide, com características de aumento da atividade antiinflamatória, freqüentemente podem acarretar em novas propriedades indesejáveis, tais como o efeito retentor de sal (no caso de derivados halogenados) e mascaramento dos processos infecciosos, osteoporose, astenia, abaixamento do limiar cerebral etc.

O mecanismo de ação desses corticosteróides sintéticos é semelhante ao dos compostos naturais e suas diferenças de potência se devem principalmente ao aumento da meia-vida e atraso na sua catabolização ao nível hepático. A título de ilustração, a meia-vida da hidrocortisona é de 98 minutos e a dos sintéticos, prednisolona e dexamentasona é de 200 minutos (Harper *et al.*, 1982).

Observando a Figura 3 e 4, pode-se entender as modificações do núcleo pregnano que têm valor como agentes terapêuticos. Os locais moleculares de alteração são mostrados, em linhas escuras e letras.

*Anel A.* A ligação dupla 4,5 e a 3-cetona são, ambas, necessárias para a atividade adrenocorticosteróide típica. A introdução de uma ligação dupla 1,2, como na prednisona ou prednisolona, aumenta a proporção entre a potência reguladora de carboidrato e a de retenção de sódio. Além disso, a prednisolona é metabolizada mais lentamente que o cortisol.

*Anel B.* A introdução de uma dupla-ligação 1-2, a metilação na posição 6 ou a halogenação, modificam a atividade antiinflamatória. A substituição  $6\alpha$  tem efeitos imprevisíveis. No caso particular do cortisol, a metilação  $6\alpha$  aumenta os efeitos antiinflamatórios, a eliminação de nitrogênio e a retenção de sódio nos seres humanos. Por outro lado, a  $6\alpha$ -metilprednisolona tem potência antiinflamatória ligeiramente maior e potência reguladora de eletrólitos menor do que a prednisolona. A adição de flúor na posição  $9\alpha$  acentua todas as atividades biológicas dos corticosteróides, aparentemente pelo seu efeito de retirada de elétrons no grupo  $11\beta$ -hidroxi.

*Anel C.* A presença de um oxigênio em C 11 é indispensável para uma potência antiinflamatória significativa e reguladora de carboidratos, mas não é necessária para elevada potência retentora de sódio, como demonstrado pela desoxicorticosterona.

*Anel D.* A 16-metilação ou hidroxilação elimina o efeito de retenção de sódio, mas modifica muito ligeiramente a potência relativa aos efeitos sobre o metabolismo e a inflamação.

Todos os esteróides antiinflamatórios atualmente usados são compostos 17 $\alpha$ -hidroxi. Embora alguns efeitos reguladores de carboidratos e antiinflamatórios possam ocorrer em compostos 17-desoxi, a expressão máxima dessas atividades requer a presença do substituto 17 $\alpha$ -hidroxi.

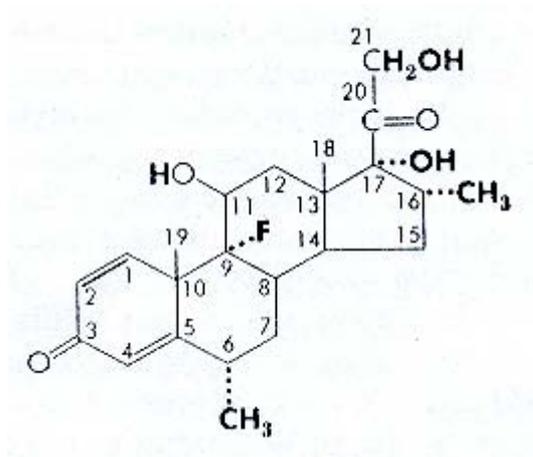


Figura 4: Relação entre estrutura e atividade dos corticosteróides. As linhas e letras claras indicam características estruturais comuns a compostos que têm ação antiinflamatória. Os pontilhados escuros e letras escuras indicam modificações que aumentam ou suprimem atividades características. (De Liddle, 1961. Cortesia do *Clinical Pharmacology and Therapeutics*.)

O corpo tem mais dificuldade de metabolizar e eliminar os corticosteróides sintéticos, por isso, estes possuem efeito mais prolongado e potência elevada. Provavelmente, a molécula modificada tenha menos tendência a ser fixada pelos sistemas enzimáticos presentes. Desta forma o início da sua atividade é imediato, porém a duração da ação varia, dependendo do fármaco. A Tabela 1 mostra que a hidrocortisona e a cortisona são de duração curta e requerem doses fracionadas várias vezes ao dia para manter o efeito. Os corticosteróides de média e longa ação administrados via oral suprimem a liberação de adrenocorticóides, mesmo em terapia de dias alternados. Algumas das ações biológicas dos corticosteróides possibilitam medidas

quantitativas e são expressas em relação a ação da hidrocortisona que é considerada 1 para atividade antiinflamatória e atividade retentora de sal.

Tabela 1: Potência relativa de alguns corticosteróides (Katzung, 1994; Harvey *et al.*, 1998).

<b>Corticosteróide</b>	<b>Atividade<sup>1</sup> antiinflamatória</b>	<b>Atividade<sup>1</sup> retentora de sódio</b>	<b>Equivalência quanto à dose oral (mg)</b>
<b>Ação curta</b>			
Hidrocortisona (cortisol)	1,0	1,0	20
Cortisona	0,8	0,8	25
Prednisona	4,0	0,3	5
Prednisolona	5,0	0,3	5
Metilprednisolona	5,0	Muito fraca	4
<b>Ação intermediária</b>			
Triancinolona	5,0	Muito fraca	4
<b>Ação prolongada</b>			
Dexametasona	30,0	Muito fraca	0,75

<sup>1</sup> Potencia relativa a ação da hidrocortisona, que é considerada igual a 1.

Os corticosteróides antiinflamatórios são valiosos no tratamento de doenças crônicas que ocorrem periodicamente e na ausência de uma causa conhecida, como artrite, tendinite, bursite, conjuntivite ou dermatite. Estes fármacos devem ser administrados localmente, sempre que possível, ao invés da via sistêmica. Pois mesmo que haja alguma absorção, o baixo nível de corticosteróide sistêmico preserva a integridade do córtex ao mesmo tempo em que mantém um alto nível local da droga.

### 1.3.4.

#### Triancinolona Acetonido

A triancinolona acetonido<sup>5</sup> (Figura 5) é um corticosteróide sintético derivado do cortisol, que difere pela presença de uma dupla-ligação entre os átomos de carbono 1 e 2 do anel A e a adição do flúor na posição 9. A presença da insaturação e do halogênio na molécula prolonga a meia-vida deste fármaco em mais de 50 % em relação a hidrocortisona.

A triancinolona tem outros sinônimos tais como 9 $\alpha$ -fluor-16 $\alpha$ -hidroxiprednisolona e fluoxiprednisolona. Seu nome químico segundo IUPAC,1979, é 9 $\alpha$ -fluor-11 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrahidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione ligada a um grupamento acetonido, apresenta fórmula estrutural C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>FO<sub>6</sub> e peso molecular de 434,5. É um pó branco ou levemente amarelado cristalino, com ponto de ebulição de 277°C. É solúvel em etanol e metanol, relativa solubilidade em acetona e clorofórmio e praticamente insolúvel em água (The Pharmaceutical Society of Great Britain,1986).

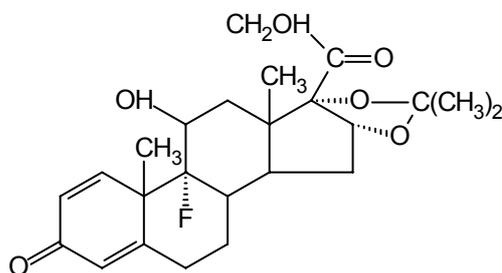


Figura 5: Estrutura molecular da triancinolona acetonido

As potências relativas de atividade antiinflamatória e de atividade retentora de sódio da triancinolona são mostradas na Tabela 1, considerando a hidrocortisona como referência, este glicocorticóide é favorecido por um aumento da atividade antiinflamatória.

Os derivados acetonido-substituídos apresentam atividade de superfície aumentada e são úteis em dermatologia. Além disso, a triancinolona acetonido é útil no tratamento tópico da rinite alérgica, estando disponível na forma de *sprays* nasais ou sendo empregada por inalação.

### 1.3.5.

#### Prednisolona

A prednisolona (Figura 6) difere de seu análogo a cortisona, somente pela presença de uma dupla-ligação entre os átomos de carbono 1 e 2, o que altera as suas atividades farmacológicas.

As potências relativas de atividade antiinflamatória e de atividade retentora de sódio da prednisolona são mostradas na Tabela 1, considerando a hidrocortisona como referência, este glicocorticóide é favorecido por um aumento da atividade antiinflamatória, além disto seu metabolismo é mais lento que o da hidrocortisona (Goodman,1987). A prednisolona também pode ser administrada na forma de uma pró-droga, como é o caso da prednisona, que é rapidamente convertida em prednisolona no organismo.

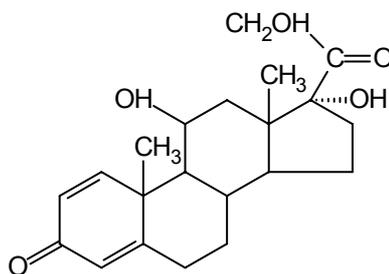


Figura 6: Estrutura molecular da prednisolona

O nome químico da prednisolona, segundo IUPAC (1979), é 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione, sendo também conhecida pelos sinônimos 1,2-dehidrohidrocortisona, deltahidrocortisona e metacortandralone. A prednisolona apresenta fórmula estrutural C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> e peso molecular de 360,4, sendo um pó branco, higroscópico e cristalino, com ponto de ebulição entre 230 a 235°C (com decomposição). É solúvel em dioxano e metanol, relativa solubilidade em etanol e clorofórmio e praticamente insolúvel em água (The Pharmaceutical Society of Great Britain,1986).

<sup>5</sup> Utilizou-se como referência à nomenclatura utilizada pelo Dicionário de especialidades farmacêuticas, 32ª edição – 2003/04.

### **1.3.6.**

#### **Corticosteróide pela visão do doping**

A principal utilização de glicocorticóides em desacordo com a sua destinação médica está relacionada à dopagem esportiva, tanto em humanos como em animais (especialmente cavalos de corrida). A principal razão para a utilização de glicocorticóides está relacionada à sua ação antiinflamatória e analgésica. A utilização destes fármacos permite a participação de atletas (e animais) com lesões articulares em provas esportivas reprimindo provisoriamente a dor e a inflamação. Disto resultam conseqüências graves para o atleta, estas, freqüentemente irreversíveis. Assim, o Comitê Olímpico Internacional (COI) restringe a utilização sistêmica de glicocorticóides de modo que as administrações pelas vias oral, retal, intravenosa e intramuscular ficam proibidas. Administrações intra-articulares e tópicas são permitidas, desde que previamente declaradas por um médico responsável. Em cavalos de corrida o uso de glicocorticóides é proibido, segundo o Código Nacional de Corridas.

### **1.4.**

#### **Controle de qualidade dos medicamentos**

Até o século XIX predominava, amplamente, na terapêutica, o uso de drogas, ou seja, os princípios ativos de produtos naturais na forma de preparações brutas. A partir daquele século, com o desenvolvimento das técnicas de isolamento de substâncias puras dos produtos naturais, e também dos métodos de elucidação das estruturas químicas, foi possível isolar e identificar os princípios ativos dos produtos naturais usados na medicina popular.

Foi apenas na primeira metade do século XX, com o desenvolvimento da síntese orgânica, que se observou a fase áurea da evolução da farmacologia, com o desenvolvimento de numerosos fármacos, que modificaram a medicina. Os fármacos de origem sintética foram, paulatinamente, substituindo os de origem natural, de tal forma que passaram a dominar amplamente.

O aumento de novos fármacos introduzidos no mercado foi vertiginoso até o início da década de 1960, quando, a partir da “Tragédia de Talidomida”<sup>6</sup>, as regras para a aprovação de novos medicamentos para uso comercial ficaram muito mais rígidas. A qualidade, a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos são uma preocupação constante dos órgãos sanitários de todos os países, sendo o setor público, por meio de agências governamentais (Federal Drug Administration, FDA, nos Estados Unidos da América e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, no Brasil) responsáveis pela definição dos parâmetros de qualidade, estabelecimento de regras, bem como pela fiscalização do seu cumprimento (Rosenberg, 1997).

Dos novos fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos anos, a grande maioria é de origem sintética (Cheng, 1995,1996; Galatisis, 1997,1998). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, em 1985 existiam 253 fármacos considerados essenciais, onde 123 (48 %) eram obtidos por síntese total. Já em 1991, no mercado farmacêutico mundial, encontravam-se disponíveis 866 fármacos, dos quais 680 (78,6 %) eram de origem sintética.

Os novos fármacos são descobertos ou planejados por um ou mais dos seguintes processos ou estratégias: ao acaso, triagem empírica, extração de fontes naturais, modificação molecular e planejamento racional. O método da modificação molecular é, no momento, o que mais contribui para a introdução de novos fármacos na terapêutica. Este método consiste na modificação estrutural de uma substância com determinada atividade farmacológica, denominado protótipo, visando obter fármacos com vantagens sobre o dito protótipo. Em geral buscam-se princípios ativos mais potentes, com menos efeitos colaterais e com maior especificidade (Reis, [19--]). Evidentemente, as modificações dos grupos funcionais ou da estereoquímica de uma substância acarretam em mudanças nas ligações fármaco-receptor e, conseqüentemente, na atividade. É preciso também considerar que as propriedades farmacocinéticas (absorção, transporte, metabolismo e excreção) são também alteradas em relação ao protótipo, pois estas são dependentes das características físico-químicas da molécula e portanto da estrutura química.

Os corticosteróides possuem várias propriedades requeridas para cobrir extenso campo de aplicação terapêutica, como atividade antiinflamatória e antialérgica, por isso

---

<sup>6</sup> A talidomida foi utilizada na década de 60 para diminuir a náusea e o vomito durante a gestação, o que levou ao nascimento de crianças com malformações congênitas.

diversos produtos foram desenvolvidos a partir de fármacos sintéticos provenientes do protótipo cortisol (hidrocortisona). Estes são lançados no mercado em diversas apresentações: comprimidos, soluções orais, soluções oftalmológicas, soluções injetáveis, aerossóis e uma vasta gama de produtos para uso tópico, como pomadas, cremes e unguentos. Estas formulações podem ser encontradas na forma pura ou associadas a outros fármacos. Existe ainda, além dos medicamentos ditos de marcas tradicionais, o medicamento genérico dos glicocorticóides. O medicamento genérico é uma alternativa que os grandes laboratórios farmacêuticos empregam, visando diminuir seu custo para o consumidor, e são produtos vendidos pelo nome de seu princípio ativo, com características farmacológicas exatamente iguais as de marcas tradicionais. No Brasil, pequenos e médios laboratórios foram credenciados pelo Ministério da Saúde para a produção de genéricos. Atualmente, segundo a ANVISA, existem no Brasil cerca de 427 medicamentos genéricos, sendo que muitos outros estão à espera de registro para serem lançados. Para serem autorizados, esses medicamentos passam por ensaios de qualidade que, mesmo após a sua aprovação, devem ser feitos periodicamente para que a presença do(s) princípio(s) ativo(s), em quantidades equivalentes aos dos medicamentos de referência, seja comprovada. Tais ensaios de monitoramento requerem metodologias analíticas simplificadas, muitas vezes com um grau de seletividade e sensibilidade apuradas além de específicos para cada medicamento comercial, já que cada um possui uma composição específica.

Na indústria farmacêutica a importância e o rigor com o controle de qualidade são bem maiores, devido os aspectos morais e éticos que estão relacionados com a produção de medicamentos. Qualquer falha no processo produtivo de medicamentos pode traduzir em risco para o paciente, podendo evoluir desde a ineficácia, à toxicidade ou até mesmo à morte. Assim, faz-se necessário um controle rigoroso dos produtos colocados no mercado, sendo a ANVISA o órgão encarregado de efetuar esta fiscalização, com poder de suspender a comercialização do medicamento caso seja identificado algum problema, seja este um defeito de fabricação ou uma falsificação. A ANVISA estabelece regras que garantem as atividades e inocuidades dos medicamentos e correlatos e de cosméticos disponíveis no mercado, passando pelo aprimoramento dos processos de pesquisa laboratorial testes de eficácia e toxicidade (Zanini, 1994). Os lotes produzidos devem apresentar características idênticas a um lote padrão e o produto deve possuir estabilidade definida mediante estudos com metodologia adequada (Prista, 1988; Brasil, 1983).

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas o controle de qualidade evoluiu significativamente. Inicialmente só havia preocupação com a matéria-prima e o produto acabado, nas últimas décadas assumiu-se um maior dinamismo passando a controlar as diversas etapas da produção, caracterizando-se mais como um processo preventivo que visa alcançar um produto final com a devida qualidade (Reis, [19--]). Desta forma é importante que metodologias analíticas estejam em constante desenvolvimento, visando à melhoria da análise em termos de: sensibilidade, seletividade, praticidade e custo.

Dentre os parâmetros farmacopéicos importantes estão:

- (1) a **identificação** do fármaco que deve ser feita por métodos físico-químicos ou químicos adotando metodologias descritas nas farmacopéias (Reis,1999).
- (2) o **doseamento**, que é realizado por meio de técnicas analíticas físico-químicas, microbiológicas e biológicas descritas nas farmacopéias. Em todas as formulações farmacêuticas, é necessário determinar o teor e potência do fármaco, através do doseamento. Com o doseamento verifica-se se o medicamento está com o teor e potência ativa dentro dos limites estabelecidos de variação em relação ao valor rotulado nos códigos farmacêuticos. Em casos de associações, deve ser realizado o doseamento dos fármacos separadamente (Reis, 1999).

## 1.5.

### **Metodologias analíticas aplicadas à determinação da prednisolona e triancinolona acetonido**

As metodologias analíticas utilizadas para a determinação de glicocorticóides, destinam,-se a analisar estes fármacos em formulações farmacêuticas visando o controle de qualidade dos medicamentos. Em matrizes biológicas a aplicação analítica dá suporte ao controle de dopagem, assim como no monitoramento de pesquisas envolvendo estes fármacos. Os pesquisadores têm-se concentrado mais no desenvolvimento de métodos analíticos para fluidos biológicos, principalmente em urina por ser de fácil coleta, e por estar disponível em maior quantidade. A principal dificuldade nestas análises é que na maioria das vezes, apenas uma pequena quantidade do fármaco é excretada na forma inalterada, enquanto que a maior parte pode estar presente como produto de biotransformação. Além disso, corticosteróides sintéticos mais recentes são excretados muito lentamente, sendo liberados em pequenas quantidades. Desta forma faz-se necessário a existência de metodologias analíticas mais sensíveis.

Para análise de triagem em controle de dopagem os métodos imunológicos (Neto *et al.*, 1996), como a técnica de radioimunoensaio (RIA – *Radioimmunoassay*) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), são muito indicados uma vez que apresentam alta sensibilidade e especificidade, necessitando de pequeno volume de material biológico e sem tratamento prévio da amostra. Porém, faz-se necessário o uso de metodologias de confirmação, com níveis de sensibilidade compatíveis com a técnica de imunoensaio, para complementar os resultados da análise.

Ao longo das últimas duas décadas, técnicas analíticas como a cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta (HPLC–UV), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC–EM) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG–EM) têm sido empregadas na detecção de esteróides polifuncionais (Pereira *et al.*, 2002).

Os métodos aplicados a HPLC-UV, tem sido os mais utilizados para determinação de glicocorticóides (Doppenschmitt *et al.*, 1995; AbuRuz *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2003), no entanto esta técnica apresenta como maiores limitações a baixa sensibilidade, havendo a necessidade de um eficiente tratamento da amostra (para extração e pré-concentração do analito) que muitas vezes não é seletivo. Como alternativa para um melhor desempenho da determinação por HPLC-UV, Neto *et al.* (1996) sugerem uma

técnica de extração sólido-líquido utilizando colunas de imunoafinidade, o que permite uma extração seletiva com boa recuperação e pré-concentração da amostra, proporcionando um aumento na sensibilidade do método.

O emprego da técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na análise de glicocorticóides preconiza a adoção de uma etapa de derivação na preparação da amostra, uma vez que a ramificação hidroxietônica na posição 17 torna os analitos passíveis de termodegradação (Baillie & Brooks, 1972). Têm-se desenvolvido vários trabalhos na tentativa de estabelecer um agente de derivação realmente eficiente, como no caso do estudo de Pereira *et al.* (2002) que utiliza N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) e o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) como agentes de silanização em presença de catálise ácida e básica.. No entanto, a falta de um procedimento eficiente na derivação dos corticosteróides tem levado pesquisadores a evitar o uso da cromatografia gasosa em métodos de rotina. Com o avanço tecnológico, métodos altamente específicos, utilizando HPLC-EM ou até mesmo HPLC-EM-EM (cromatografia em duas dimensões), tem sido propostos para detecção de corticosteróides (Teale *et al.*, 2003; Gotzmann *et al.*, 2003; koupai-abyazani *et al.*, 1995). Estas técnicas possibilitam a identificação da substância e sua determinação com alta sensibilidade, porém o custo é muito alto.

Os métodos desenvolvidos para análise destes fármacos em urina e sangue (ou plasma sanguíneo) giram em torno da cromatografia líquida, alguns trabalhos podem ser citados (Cho *et al.*, 2003; Doppenschmitt *et al.*, 1995; AbuRuz *et al.*, 2003) em que as metodologias utilizadas envolvem extração, da prednisolona, prednisona e hidrocortisona, da matriz com solvente orgânico (extração líquido-líquido) ou ainda extração em fase sólida analisando o extrato em HPLC-UV, obtendo limites de quantificação (LQ) de 2 à 11 ng mL<sup>-1</sup>. Na cromatografia em fase gasosa com detector de massas podemos citar estudos feitos por Amendola (2003), que desenvolve uma metodologia de triagem e confirmação para 6 glicocorticóides endógenos e 17 sintéticos, em urina humana, por derivação. Foram testados procedimentos com diferentes misturas de reagentes derivatizantes, utilizando a energia de microondas como fonte de calor. Esta metodologia obteve LDs para os glicocorticóides sintéticos na faixa de 3 à 25 ng mL<sup>-1</sup>, sendo 4 e 3 ng mL<sup>-1</sup> para prednisolona e triancinolona acetinado, respectivamente. No entanto esta metodologia é trabalhosa e longa por ter que se lidar com toda a problemática da reação de derivação. Rodchenkov (1988, 1998, 1990), tem estudado métodos analíticos para a determinação dos metabólitos da

prednisolona, triancinolona acetonido e de outros glicocorticóides sintéticos, também utilizando reações de derivação e posterior separação e detecção por CG-EM.

Trabalhos mais recentes substituem a CG-EM por HPLC-EM ou ainda HPLC-EM-EM, acabando com a necessidade de se formar derivados destas moléculas que apresentem maior estabilidade térmica.

Na área de controle de dopagem, em humanos (Frerichs, 2004) e cavalos (Popot *et al.*, 2003; Gotzmann *et al.*, 2003; Teale *et al.*, 2003), a técnica de HPLC-EM já esta sendo muito utilizada, visando à necessidade de métodos sensíveis, seletivos, reprodutivos e confiáveis, como demonstra Gaillard (1999) que trabalhou com urina e cabelo de ciclistas para determinação de anfetaminas, anabolizantes e corticosteróides (dentre eles a prednisolona e triancinolona acetonido) utilizando HPLC-EM-EM e CG-EM.

Uma alternativa para determinação destes fármacos é a utilização de métodos espectrofluorimétricos e por quimiluminescência. Iglesias *et al.* (2002) utilizou luminol como reagente, para determinação de prednisolona e triancinolona em plasma por HPLC, com limites de detecção na ordem de 2 à 15 ug mL<sup>-1</sup>. Outros trabalhos têm sido desenvolvidos para prednisolona em plasma com reagentes fluorogênicos e posterior análise por HPLC-fluorescência, é o caso de Yamaguchi *et al.*, 1991, que utiliza metilenodioxibenzeno (DMB), a obteve LD de 3 ng mL<sup>-1</sup>, porém, essa metodologia não se mostrou eficiente para triancinolona. Já Katayama *et al.*, 1993 utiliza uma pré-derivação em linha com 2-(4-carboxifenil)-5,6-dimetilbenzimidazole (CDB) e Shibata *et al.*, 1998, alcança LD de 0,1 ng mL<sup>-1</sup> utilizando 9-anthoroyl nitrile, no entanto, essa é uma técnica trabalhosa e pouco viável para análise de rotina.

Para determinação de glicocorticóides em formulações farmacêuticas não existem muitos trabalhos publicados, no entanto também se utiliza a HPLC-fluorescência após derivação química (Koukli, 1990), como foi o caso de Pan & Yu (2004) que desenvolveram duas metodologias de determinação de triancinolona acetonido por HPLC com detecção fluorimétrica aplicando uma reação de derivação utilizando beta-ciclodextrina (beta-CD), que gerou LD de  $1,8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> e com brometo de cetiltrimetilamonio (CTMAB), apresentando LD de  $3,59 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. Estas metodologias foram utilizadas para medicamentos injetáveis. Para determinação de triancinolona acetonido em creme (Matysova, 2003; Gordon, 1976) e suspensão (Xu, 1999; Gordon, 1976), associado ou não a outros componentes, tem-se utilizado métodos simples e rápidos utilizando o HPLC-UV em 240 nm, estas metodologias

podem ser aplicadas ao controle de qualidade com sucesso por proporcionarem recuperação e coeficiente de variação satisfatórios aos critérios analíticos. Já para determinação de prednisolona em solução e creme, Gallego & Arroyo (2003,2003,2003), desenvolveram técnicas utilizando cromatografia capilar eletrocinética em meio micelar, apresentando bons resultados. A cromatografia líquida também foi utilizada para tabletes e comprimidos (Brower, 1984). Em um trabalho recentemente publicado, Görög (2004), apresenta um levantamento baseado nas monografias publicadas nas últimas edições da Farmacopéia Européia, Farmacopéia dos Estados Unidos e da Farmacopéia Japonesa onde são comentados os recentes avanços na determinação de hormônios e outros esteróides utilizando técnicas analíticas na área da espectroscopia, espectrofotometria e cromatografia. Neste trabalho a prednisolona e a triancinolona acetato são citadas em uma tabela em que se reúnem as metodologias utilizadas nas Farmacopéias européia, americana e japonesa, todas utilizam HPLC-UV com coluna de fase reversa.