

Anete Lopes Coelho

**Desenvolvimento de procedimento de derivatização
fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos
(prednisolona e triancinolona acetonido) visando à análise
espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro
Setembro de 2004



Anete Lopes Coelho

**Desenvolvimento de procedimento de derivatização
fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos
(prednisolona e triancinolona acetonido) visando à análise
espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo assinada.

Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador
Departamento de Química - PUC-Rio

Andréa Fernandes Arruda

Instituto de Química - UnB

Ricardo Jorgensen Cassella

Instituto de Química - UFF

Roberta Lourenço Ziolli

Departamento de Química - PUC-Rio

Zuleica Carmen Castilhos

Centro de Tecnologia Mineral - CETEM

José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 13 de setembro de 2004

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do Professor orientador.

Anete Lopes Coelho

Graduada em Química Industrial pela Faculdade Nuno Lisbôa em 1992. Trabalhou na Companhia de Cigarros Souza (1986 - 1996) em análise de aditivos e controle de defensíveis agrícolas com técnicas cromatográficas. Atualmente atua no Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, na função de Química analista III, coordenando a área técnica e desenvolvendo metodologias para controle de dopagem.

Ficha Catalográfica

Coelho, Anete Lopes

Desenvolvimento de procedimento de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetato) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas / Anete Lopes Coelho ; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Química 2004.

119 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química.

Inclui referências bibliográficas.

1. Química – Teses. 2. Prednisolona. 3. Triancinolona acetato. 4. Glicocorticóides. 5. Derivatização fotoquímica. 6. Espectrofluorimetria. 7. Formulações farmacêuticas. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento

CDD:540

Ao meu filho Eric,
que é a minha fonte de inspiração e
meu maior tesouro.
Com todo meu amor e carinho.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado força para chegar ao final desta jornada.

A Eric e André, por toda paciência e apoio.

Aos meus pais, minha irmã e minha avó por todo o amor e atenção.

Ao meu orientador, Ricardo Queiroz Aucélio. Pela segura orientação, confiança e dedicação e pelo excelente convívio durante todo o mestrado.

Ao Professor José Ricardo Bergman (Coordenador Central de Pós-Graduação e Pesquisa da PUC-RJ) e ao Departamento de Química, em especial, a Professora Isabel Moreira Neto (Coordenadora da Pós-Graduação do DQ) por terem compreendido os motivos do atraso da minha defesa de dissertação, mesmo sabendo que tal atraso poderia prejudicar os índices de avaliação do Departamento.

À PUC-Rio, pelo suporte indispensável para a realização deste trabalho.

Ao Jockey Club Brasileiro, pela disponibilização de equipamentos e material utilizado durante este trabalho.

À minha chefe imediata, Marta B. Tozzi, Gerente do LAD/JCB, pelo incentivo e amizade. E por todo o apoio e estrutura que me permitiram desenvolver este trabalho.

Aos colegas do LAD/JCB, Adhemar, Andreia, Carla, Eunice, Jair pelo companheirismo e cumplicidade.

À amiga India, pela permanente força, incentivo e parceria.

À estagiaria Evellyn, pela ajuda no desenvolvimento prático do trabalho.

A Antonio Luiz de Araújo, funcionário do Jockey Club, por sua ajuda na manufatura dos equipamentos.

Ao técnico Anselmo, por sua disponibilidade e sua boa vontade em ajudar sempre que necessário.

Aos professores da Banca Examinadora.

À toda a equipe do LEEA-PUC-RJ.

Aos meus colegas da PUC-Rio, em especial Mônica Penna.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Resumo

Coelho, Anete Lopes; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento de procedimento de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetonido) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas.** Rio de Janeiro, 2004. 119p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os glicocorticóides sintéticos tais como a triancinolona acetonido e a prednisolona não possuem fluorescência natural e nem são induzidos a fluorescer por meio do procedimento padrão para glicocorticóides naturais, que consiste no tratamento com ácido sulfúrico concentrado. No presente trabalho, um procedimento de derivação fotoquímica para triancinolona acetonido e prednisolona foi desenvolvido e cuidadosamente otimizado com o intuito de se obter derivados fluorescentes estáveis que permitiram elaborar um método espectrofluorimétrico para determinação dos mesmos em formulações farmacêuticas. Este procedimento consistiu na exposição à radiação ultravioleta (300 nm) de soluções ácidas dos glicocorticóides sintéticos em reator fotoquímico. Parâmetros experimentais, tais como tipo e concentração do ácido, temperatura e tempo de aquecimento, sistema de solventes e tempo de exposição ao UV se mostraram críticos e por isso foram cuidadosamente estudados. As características do reator também se mostraram importantes para o sucesso do procedimento. A intensidade da fluorescência (excitação em 240 nm e emissão em 350 nm) e a estabilidade dos fotoprodutos se mostraram apropriados para permitir o desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico. Parâmetros instrumentais importantes, tais como banda espectral de passagem e a velocidade de varredura foram otimizados, visando à obtenção da melhor razão sinal do analito/sinal do branco e da melhor resolução espectral. Parâmetros analíticos de mérito, obtidos a partir das curvas analíticas, revelaram limites de detecção de 5 e 6 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para triancinolona acetonido e prednisolona, respectivamente; e limites de quantificação de 17 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para a triancinolona acetonido e 19 $\eta\text{g mL}^{-1}$ para a prednisolona. As faixas lineares dinâmicas, nos dois casos, se estenderam por três ordens de grandeza com coeficientes de linearidade (r^2) de 0,99. Este método espectrofluorimétrico foi testado em formulações farmacêuticas, obtendo-se os melhores resultados para os comprimidos e soluções injetáveis. Estudos para

avaliar o efeito de dois potenciais interferentes (polimixina B e benzocaína) também foram realizados. Resultados de recuperação foram avaliados tomando como referência os valores indicados na bula do medicamento e também valores obtidos com o procedimento de referência (HPLC com detecção fotométrica UV-vis) utilizado no Jockey Club Brasileiro, obtendo resultados entre 97 ± 14 e 104 ± 6 %.

Palavras-chave

Prednisolona, Triancinolona acetonido, Glicocorticóides, Derivatização fotoquímica, Espectrofluorimetria, Formulações farmacêuticas.

Abstract

Coelho, Anete Lopes; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Development of a photochemical derivatization procedure for two synthetic glucocorticoids (prednisolone and triamcinolone acetonide) aiming the spectrofluorimetric analysis of pharmaceutical formulations.** Rio de Janeiro, 2004. 119p. Master's Degree Paper – Graduate Program in Analytical Chemistry. PUC-Rio (Rio de Janeiro Pontifical Catholic University).

The synthetic glucocorticoid such as triamcinolone acetonide and prednisolone neither present natural fluorescence nor fluorescence can be induced by means of the standard procedure used for natural glucocorticoids which consists on a treatment with concentrated sulfuric acid. In the present work, a photochemical derivatization procedure for these two synthetic glucocorticoids was developed and carefully optimized aiming the obtantion of fluorescent derivatives stable enough to allow the development of a spectrofluorimetric method for determination of these analytes in pharmaceutical formulations. The photochemical derivatization procedure consisted on the exposure of acidic solutions of these synthetic glucocorticoids to the ultraviolet radiation (300 nm) in a photochemical reactor. Experimental parameters such as type and concentration of the acid, temperature and heating time, solvent system and UV exposition time have shown to be critical and therefore they were carefully studied. The design of the photochemical reactor) has also shown to be relevant for the success of the procedure. The intensity of the fluorescence (with maximum excitation and emission wavelenghts at 240 nm and 350 nm respectively) and the stability of these photoproducts, have shown to be appropriated for the development of a spectrofluorimetric method. Important instrumental parameters such as spectral bandpass and scan velocity have been optimized aiming the achievement of best signal-to-blank ratio and spectral resolution. Analytical parameters of merit, obtained from the analytical curve, have indicated limits of detention of 5 and 6 $\eta\text{g mL}^{-1}$ for triamcinolone acetonide and prednisolone, respectively, and limits of quantification of 17 $\eta\text{g mL}^{-1}$ for triamcinolone acetonide and 18 $\eta\text{g mL}^{-1}$ for prednisolone. The linear dynamic range for both analytes extended over three orders of magnitude with linear coefficients (r^2) of 0,99. The spectrofluorimetric method was tested by the analysis of pharmaceutical formulations, with best

performance for tablets and injectable solutions. A study to evaluate the effect of two potential interferents (polimixine B and benzocaine) has also been made. Recovery results were evaluated using both, the reference values indicated in the medicine instructions and concentration values obtained using the reference procedure (HPLC with UV-visible photometric detection) used in the Brazilian Jockey Club. Satisfactory recovery results were achieved (between 97 ± 14 and 104 ± 6 %).

Keywords

Prednisolone, Triamcinolone acetonide, Glucocorticoids, Photochemical derivatization, Spectrofluorimetry, Pharmaceutical formulations.

Sumário

1	Introdução	18
1.1.	Mecanismo da inflamação	18
1.2.	Antiinflamatórios não-esteroidais	22
1.2.1.	Aspirina e outros salicilatos	23
1.2.2.	Derivados dos ácidos propiônico	23
1.2.3.	Derivados dos ácidos indol-acéticos	23
1.2.4.	Derivados das oxicanas	24
1.2.5.	Outros AINEs não-seletivos	24
1.2.6.	AINEs seletivos	25
1.3.	Antiinflamatórios esteroidais - Corticosteróides	26
1.3.1.	Ação antiinflamatória	27
1.3.2.	A química dos glicocorticóides	28
1.3.3.	Glicocorticóides sintéticos	29
1.3.4.	Triancinolona Acetonido	33
1.3.5.	Prednisolona	34
1.3.6.	Corticosteróide pela visão do doping	35
1.4.	Controle de qualidade dos medicamentos	35
1.5.	Metodologias analíticas aplicadas à determinação da prednisolona e triancinolona acetono	39
2	Espectrometria de fluorescência molecular	43
2.1.	Fluorescência molecular	43
2.1.1.	O Fenômeno	43
2.1.2.	Fatores que afetam a fluorescência	45
2.1.3.	Relações quantitativas	48
2.2.	Derivação fotoquímica	51
2.3.	Objetivos do Trabalho	52
3	Materiais e métodos	53
3.1.	Reagentes	53

3.2. Instrumentação	54
3.2.1. Reatores fotoquímicos	54
3.2.2. Espectrofluorímetro	57
3.2.3. Cromatógrafo	57
3.2.4. Equipamentos auxiliares	58
3.3. Procedimentos	59
3.3.1. Lavagem do material	59
3.3.2. Preparação dos padrões e amostras para tratamento fotoquímico	59
3.3.3. Preparação das curvas analíticas e procedimento de adição de analito	60
3.3.4. Formulações farmacêuticas	60
3.3.5. Procedimento para a medição no espectrofluorímetro	61
3.3.6. Procedimento para medição no cromatógrafo líquido	61
4 Resultado e discussão: Otimização do procedimento de derivação fotoquímica	62
4.1. Informações preliminares	62
4.2. Estudo do efeito da radiação ultravioleta	63
4.2.1. Fluorescência dos glicocorticóides e comparação entre reatores	63
4.2.2. Otimização do tempo de irradiação	67
4.2.3. Absortividade molar e espectro de absorção	68
4.3. Otimização do sistema de solventes	71
4.3.1. Solubilidade, pressão de vapor e magnitude do sinal fluorescente	72
4.3.2. Magnitude do sinal do branco	74
4.4. Otimização do tratamento ácido	75
4.5. Escolha dos parâmetros instrumentais	77
4.6. Resumo das condições instrumentais e experimentais	81
4.7 Estabilidade dos fotoprodutos	83
5 Resultado e discussão: Avaliação dos métodos	85
5.1. Parâmetros analíticos de mérito	85
5.1.1. Sensibilidade	86
5.1.2. Resposta linear	88
5.1.3. Precisão	89

5.2. Avaliação de potenciais substância interferentes	91
5.3. Análise de medicamentos comerciais (testes de recuperação em amostras reais)	95
6 Resultados e discussão: Avaliação da viabilidade do uso do procedimento de derivação fotoquímica de glicocorticóides em cromatografia líquida, para fluidos biológicos.	101
6.1. Interferência da hidrocortisona	101
6.2. Otimização dos parâmetros experimentais da detecção fluorimétrica no HPLC	102
6.3. Cromatografia em condições extremamente ácidas e neutralização da amostra	103
6.4. Testes de retenção	105
6.5. Sugestões para utilização da cromatografia líquida com o procedimento de derivação fotoquímica	107
7 Conclusão	108
8 Referências bibliográficas	110

Lista de figuras

- Figura 1: Esquema mostrando a síntese de prostraglandinas e leucotrienos. (Fonte: Farmacologia Ilustrada 2ª edição – Harvey *et al.*, 1998) 21
- Figura 2: Vantagens e desvantagens dos AINEs. (Adaptado de Harvey *et al.*, 1998) 25
- Figura 3: Estrutura molecular da hidrocortisona (cortisol). 28
- 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.*) 31
- Figura 5: Estrutura molecular da triancinolona acetinado 33
- Figura 6: Estrutura molecular da prednisolona 34
- Figura 7: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto. 44
- Figura 8: Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental, (S_n) estado excitado singleto, (S_1) primeiro estado excitado singleto, (RV) relaxamento vibracional, (CI) cruzamento interno, (CSI) cruzamento intersistemas, (T_n) estado excitado tripleto. (Adaptado de Cardoso, 2003) 44
- Figura 9: Representação esquemática dos reatores fotoquímicos: (A) Reator com lâmpada germicida de vapor de mercúrio (24 W de potência) e (B) Reator com lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W. 56
- Figura 10: Fluorescência medida nas soluções-teste, para estudo de eficiência entre dois reatores diferentes. 64
- Figura 11: Espectros de fluorescência da prednisolona e triancinolona acetinado em solução de concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol/água 66
- Figura 12: Espectros de fluorescência da prednisolona em função do aumento da concentração. As curvas A, B e C referem-se as concentrações de 8, 16 e $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. 67
- Figura 13: Efeito do tempo de exposição à radiação UV na fluorescência dos

- fotoprodutos da (A) prednisolona e da (B) triancinolona acetato. 68
- Figura 14: Espectros de absorção da prednisolona e triancinolona acetato. 69
- Figura 15: Espectro de absorção dos fotoprodutos da prednisolona e triancinolona acetato, após processo de derivação fotoquímica. 70
- Figura 16: Curvas analíticas espectrofotométricas dos fotoprodutos da (A) triancinolona acetato e (B) prednisolona. 71
- Figura 17: Efeito do percentual de metanol na mistura reacional na fluorescência do fotoproduto da (A) prednisolona e da (B) triancinolona acetato. 73
- Figura 18: Curva do efeito da concentração do ácido sulfúrico em solução na fluorescência dos fotoprodutos da (A) prednisolona e (B) triancinolona acetato. 77
- Figura 19: Efeito da velocidade de varredura no espectro de fluorescência dos derivados dos glicocorticóides. 79
- Figura 20: Efeito do valor da banda de passagem espectral nos espectros fluorescentes da prednisolona e da triancinolona. 81
- Figura 21: Estudo da fluorescência do fotoproduto da prednisolona em função do tempo. Soluções acondicionadas em (A) temperatura ambiente, (B) refrigerado a 4°C e (C) temperatura ambiente com ausência da luz. As curvas indicam a intensidade fluorescente do branco I_b (\diamond), do analito I_f (\square) e fluorescência líquida $I_f - I_b$ (Δ). 84
- Figura 22: Estudo da fluorescência do fotoproduto da triancinolona acetato em função do tempo. Soluções acondicionadas em (A) temperatura ambiente, (B) refrigerado a 4°C e (C) temperatura ambiente com ausência da luz. As curvas indicam a intensidade fluorescente do branco I_b (\diamond), do analito I_f (\square) e fluorescência líquida $I_f - I_b$ (Δ). 84
- Figura 23: Curvas analíticas de calibração (A) da prednisolona e (B) da triancinolona acetato após procedimento de indução fotoquímica de fluorescência. 86
- Figura 24: Espectro de fluorescência (A) da benzocaína em comparação ao do branco (B). 92
- Figura 25: Espectro de fluorescência (A) da polimixina B em comparação ao do branco (B). 92
- Figura 26: Curva de adição de analito para análise do Prelone (comprimido)

utilizando a indução fotoquímica de fluorescência.

99

Figura 27: Cromatogramas adquiridos no HPLC HP-1050 com detector de fluorescência HP-1046A. Utilizando coluna SymmetryShield RP18 3,5 μm (4,6 x 150mm) da Waters, com fase móvel acetonitrila/água (40/60, v/v), vazão de 0,8 mL min^{-1} .

106

Lista de tabelas

Tabela 1: Potência relativa de alguns corticosteróides (Katzung,1994; Harvey <i>et al.</i> , 1998).	32
Tabela 2: Intensidade do sinal fluorescente de soluções metanólicas (metanol/água - 40/60, v/v) preparados com o metanol oferecido por 4 diferentes fornecedores à (240/350 nm) após o tratamento fotoquímico.	75
Tabela 3: Efeito do valor da banda de passagem espectral no espectro fluorescente da prednisolona.	80
Tabela 4: Efeito do valor da banda de passagem espectral no espectro fluorescente da triancinolona acetinado.	80
Tabela 5: Resumo das condições experimentais e instrumentais utilizadas na derivação fotoquímica da prednisolona e triancinolona acetinado.	82
Tabela 6: Parâmetros de mérito relativos à sensibilidade	88
Tabela 7: Parâmetros de mérito relativo à linearidade da resposta analítica.	89
Tabela 8: Parâmetros de mérito relativo à precisão.	90
Tabela 9: Estudo do efeito interferente da benzocaína na fluorescência da prednisolona após derivação fotoquímica.	94
Tabela 10: Estudo do efeito interferente da Polimixina B na fluorescência da prednisolona após derivação fotoquímica.	94
Tabela 11:Descrições dos medicamentos analisados segundo as respectivas bulas.	96
Tabela 12: Recuperações ^a obtidas para a prednisolona em formulações comerciais.	100
Tabela 13: Recuperações ^a obtidas para a triancinolona acetinado em formulações comerciais.	100
Tabela 14: Fluorescência (240/350 nm) da hidrocortisona e prednisolona após procedimento de derivação fotoquímica.	101
Tabela 15: Parâmetros otimizados para detecção de fluorescência no HPLC	103