

Estudo da estabilidade de amostras de solução oral contendo o hormônio coriônico gonadotrófico (HCG) como princípio ativo.

Study of the stability of samples in oral solution containing human chorionic gonadotropin (HCG) as active principle

BARBOSA, S.V.P.¹; RIBEIRO, M.S.P.¹; GUEDES, L.F.P.²; *DE PAULA JR, W.¹

1 Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros – Minas Gerais, Brasil;

2 Drogaria Minas Brasil, Montes Claros – Minas Gerais, Brasil;

Autor Correspondente: *Waldemar de Paula Júnior

Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Departamento de Fisiopatologia- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde | Av. Prof. Rui Braga, S/N - Vila Mauriceia, Montes Claros - MG, 39401-089 | E-mail: wdepaulajr@gmail.com |

Telefone: +55 38 99190 7235

Recebido em 29/03/2019; Aceito em 05/04/2019

Resumo

O Hormônio Coriônico Gonadotrófico (HCG) aumenta o metabolismo de emulsões lipídicas acelerando a oxidação de gorduras e tem sido utilizado em tratamentos dietéticos promovendo perda de gordura corporal. O HCG pode ser administrado de forma intramuscular ou sublingual. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade de amostras de solução oral do HCG armazenadas em diferentes condições. Foram utilizadas amostras de solução oral contendo HCG obtidas em uma farmácia de manipulação do Norte de Minas Gerais. As amostras foram diluídas 1:200 em solução salina e armazenadas a 8°C ou a temperatura ambiente (27°C). Durante 8 semanas a pesquisa qualitativa de HCG nas amostras foi realizada por meio de ELISA Direto (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). As amostras armazenadas a 8°C e a temperatura ambiente se mantiveram positivas sugerindo que não houve perda de HCG no período avaliado. Os resultados obtidos demonstram que as formas de armazenamento avaliadas não interferem na concentração do princípio ativo sugerindo a manutenção da sua eficácia.

Palavras-chaves: Gonadotrofina Coriônica Humana, terapia com HCG, metabolismo.

Abstract

Gonadotropic Chorionic Hormone (HCG) increases the metabolism of lipid emulsions accelerating fat oxidation and has been used in dietary treatments promoting loss of body fat. HCG may be administered intramuscularly or sublingually. The objective of this work was to evaluate the stability of HCG oral solution samples stored under different conditions. Oral solution samples containing HCG were obtained from a handling pharmacy in the north of Minas Gerais. Samples were diluted 1:200 in saline and stored at 8°C or room temperature (27°C). For 8 weeks the qualitative HCG screening of the samples was performed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Samples stored at 8°C and room temperature remained positive suggesting that there was no loss of HCG during the period evaluated. The results show that the storage forms evaluated do not interfere with the concentration of the active principle suggesting the maintenance of its effectiveness.

Keywords: Human Chorionic Gonadotropin, HCG therapy, metabolism. .



INTRODUÇÃO

A Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG) pertence à família das glicoproteínas heterodiméricas hipofisárias: LH (Hormônio Luteinizante), FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e TSH (Hormônio Tíreo Estimulante), os quais são constituídos por duas subunidades, alfa e beta, ligadas por interações hidrofóbicas. A subunidade alfa, comum a todos eles, é codificada por um gene localizado no cromossomo 6, enquanto a subunidade beta do HCG é transcrita por seis genes (SAAVEDRA, 2004), sendo responsável pela especificidade biológica e imunológica da molécula. Diferentemente das outras glicoproteínas hipofisárias, a subunidade beta do HCG possui 45 aminoácidos adicionais na cadeia peptídica e difere quanto ao conteúdo de carboidrato presente nas moléculas de LH e FSH. Quando dissociadas, as subunidades alfa e beta perdem sua atividade biológica e a sua posterior recombinação restaura apenas 80% de sua atividade original (MEDEIROS, 2006).

Existem cinco variantes de HCG: molécula íntegra, HCG sulfatado, hiperglicosilada, subunidade beta livre e a subunidade beta livre hiperglicosilada. Embora possuam sequências idênticas de aminoácidos, podem diferir-se quanto às células de origem e suas funções, as quais estão relacionadas com a implantação do blastocisto, desenvolvimento placentário, crescimento fetal e uterino, além de inúmeras outras funções essenciais na gravidez.

A variante sulfatada é produzida pela hipófise feminina e participa da esteroidogênese durante o ciclo menstrual e ovulação do oócito (COLE, 2012).

A subunidade beta hiperglicosilada livre de HCG é produzida no momento da implantação e em proporções muito baixas no decorrer da gestação (COLE, 2012).

Nos últimos anos, o HCG tem mostrado numerosas funções na placenta e no útero funcionando como promotor de angiogênese e vasculogênese agindo

sobre receptores de LH/HCG nas artérias espiraladas uterinas garantindo o fornecimento de sangue para a placenta e nutrição adequada para o feto (POLEC et al., 2014).

Enquanto o HCG íntegro é produzido pelo sinciciotrofoblasto. O citotrofoblasto produz a variante hiperglicosilada do HCG, considerada como um fator autócrino iniciando e promovendo a invasão celular na implantação da gravidez, o estabelecimento hemocorial placentário e atuando na presença de malignidade como ocorre na mola hidatiforme invasiva e coriocarcinoma. A variante hiperglicosilada do HCG tem sido utilizada como marcador de fetos com síndrome de Down no primeiro e segundo trimestres da gravidez. É utilizado também como marcador preventivo para distúrbios hipertensivos e para pré-eclâmpsia no terceiro trimestre e segundo trimestre de gestação, respectivamente (COLE, 2010).

O tratamento de crianças do sexo masculino, portadoras de distrofia adiposa genital, com HCG demonstrou melhora nas condições de seus testículos. Além disso, foi observado que durante o tratamento houve alterações na distribuição da gordura corporal sugerindo que crianças submetidas concomitantemente ao HCG e a dieta hipocalórica poderiam reduzir seu peso corporal. (BELLUSCIO, 2009). Estudos demonstraram que pacientes com diversos graus de obesidade sob tratamento com HCG toleravam a dieta hipocalórica sem sofrer com cefaleias, irritabilidade e debilidade, tão comuns nos tratamentos para redução de peso. (BELLUSCIO, 2009; GREENWAY, 1977; SABINE, 1995). Comparando o tratamento do HCG associado a dietas hipocalóricas com dietas mais simples, pode-se elencar vários aspectos positivos: período de manutenção mais efetivo, redução mais satisfatória de peso, perda de maior quantidade de gordura corporal (medida em centímetros) em áreas onde os depósitos adiposos eram mais notáveis e atuação do HCG seria em nível diencefálico como provável modulador do



centro hipotalâmico regulatório, responsável pela acúmulo excessivo de gordura, comum na obesidade (BELLUSCIO, 2009).

O tratamento da obesidade a base de HCG tem sido descrito desde 1954, quando Simeons publicou sua técnica para redução de peso. Seu método, consistia de uma rígida e estruturada dieta hipocalórica de 500 calorias associada à administração de injeções intramusculares contendo 125 UI de HCG durante 6 dias por semana. A perda significativa de peso com esta combinação pode ser atribuída à supressão do apetite pelo HCG e melhora o humor. Assim, o paciente torna-se mais apto a aderir à dieta prescrita e permanecer no tratamento (STEIN, 1976).

Estudos têm relatado a participação do HCG na lipólise do tecido adiposo humano inibindo a lipogênese. FLEIGELMAN (1970) demonstrou que a administração de HCG em ratos diminuiu a atividade da alfa-glicerofosfatodesidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase a partir do fígado e tecido adiposo promovendo diminuição da atividade lipogênica nestes locais. O HCG acelera a mobilização dos depósitos de gordura e aumenta o metabolismo de emulsões lipídicas acelerando a oxidação da gordura com produção de cetona no fígado e sua utilização em tecidos periféricos (BELLUSCIO, 2009).

Pacientes, durante o tratamento com o HCG podem apresentar alterações em alguns parâmetros laboratoriais, comuns ao processo de redução de peso, como diminuição nos valores do hematócrito, leucócitos, ureia, colesterol e triglicérides e aumento na concentração de glicose em jejum e de ácido úrico (STEIN, 1976).

BRYMAN (2010) associou o HCG sublingual com aumento no teor calórico e protéico de uma dieta para estudar os seus efeitos na perda de peso. Tal estudo, concluiu que a forma sublingual do HCG mostrou ser significativamente melhor na perda de peso em pacientes abordados com a dieta modificada e HCG

quando comparados um grupo com substituição dietética. Além disso, não houve relato de nenhum efeito colateral nos pacientes que usaram HCG sublingual.

Os hábitos culturais incluindo consumo de alimentos e lazer interferem no metabolismo de uma determinada população. Atualmente, a busca por produtos que reduzem o peso corporal visa tratamento estético, mas acima de tudo, manutenção da saúde. Neste contexto, é fundamental, a participação multiprofissional a fim de contribuir para a melhora na qualidade de vida do paciente e da população em geral. O farmacêutico magistral pode fornecer dados sobre uma determinada formulação que auxilie o médico na sua conduta clínica. Tais informações podem estar relacionadas com a forma farmacêutica, doses personalizadas, interações e, sobretudo, condições de armazenamento de um determinado produto. Neste contexto, a estabilidade de uma forma farmacêutica precisa ser avaliada para que orientações necessárias sobre prazo de validade e condições de armazenamento sejam seguidas pelo paciente. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade das amostras de solução oral contendo o hormônio coriônico gonadotrófico humano como princípio ativo.

METODOLOGIA

Duas amostras de solução oral contendo hormônio coriônico gonadotrófico humano foram obtidas em uma farmácia de manipulação do Norte de Minas Gerais. As amostras apresentavam a mesma concentração e o mesmo prazo de validade. Cada amostra foi diluída com solução salina 0,9% até atingir a diluição de 1:200 e armazenada sob diferentes condições de temperatura: geladeira (8°C) e ambiente (27°C) ao abrigo da luz. As amostras foram avaliadas, semanalmente, por meio de análise semiquantitativa durante um período de 9 semanas. A análise foi realizada pelo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

direto, cujo princípio baseia-se em desenvolvimento de coloração a partir de reações antígeno-anticorpo. Para a pesquisa do HCG nas amostras, foram utilizadas placas sensibilizadas com anticorpos anti-HCG adicionadas de amostras para a semiquantificação. Antígenos presentes nas amostras ligam-se aos anticorpos aderidos à placa. Posteriormente, são adicionados anticorpos, específicos para o HCG, marcados com enzima, que se liga ao HCG aderido ao anticorpo da placa. Ao adicionar substrato, ocorre uma reação enzima-substrato com alteração de cor. O kit utilizado na realização do teste foi Kit KATAL - ELISA β-HCG Visual e todo o procedimento seguiu as recomendações do fabricante. Resumidamente, na placa de ELISA foram depositados 50µl de solução salina a 0,9% em todos os oito poços. 50µl da amostra da solução oral foi adicionada no primeiro poço, homogeneizada obtendo-se uma diluição 1:2. Após este processo, 50µl do homogeneizado foram retirados e transferidos para o poço seguinte, repetindo o mesmo processo nas demais cavidades contendo a solução salina obtendo-se diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. 50 µl do homogeneizado do último poço foram descartados, com posterior incubação de cinco minutos em temperatura ambiente. Após esse período, cada poço foi submetido a cinco lavagens com água destilada. 50µl do conjugado (anticorpo ligado à enzima peroxidase) foram adicionados em cada poço da placa com posterior incubação de cinco minutos em temperatura ambiente. Cada poço foi novamente lavado por cinco vezes. Em seguida, 50µl do Substrato (H₂O₂) foram adicionados e o desenvolvimento de cor foi observado. A reação positiva foi evidenciada pela reação antígeno-anticorpo com o desenvolvimento de coloração azulada. A quantidade de HCG presente na amostra é estimada pela última diluição com reação positiva (desenvolvimento de cor). Todo o procedimento foi realizado para a amostra de solução oral contendo HCG armazenada em geladeira e temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de avaliação (Tabela 1), todas as amostras mostraram-se positivas para a presença de HCG. Embora o desenvolvimento de cor tenha sido observado em todas as dosagens semanais na amostra armazenada em geladeira e em temperatura ambiente, houve uma diminuição na intensidade de cor nas duas amostras (Figura 1).

Tabela 1. Avaliação semanal das soluções contendo HCG.

| Semana | Diluição | |
|--------|-----------|----------|
| | Geladeira | Ambiente |
| 1 | 1:256 | 1:256 |
| 2 | 1:256 | 1:256 |
| 3 | 1:256 | 1:256 |
| 4 | 1:256 | 1:256 |
| 5 | 1:256 | 1:256 |
| 6 | 1:256 | 1:256 |
| 7 | 1:256 | 1:128 |
| 8 | 1:256 | 1:128 |
| 9 | 1:256 | 1:128 |

Temperatura: Geladeira (8°C) / Ambiente (27°C)

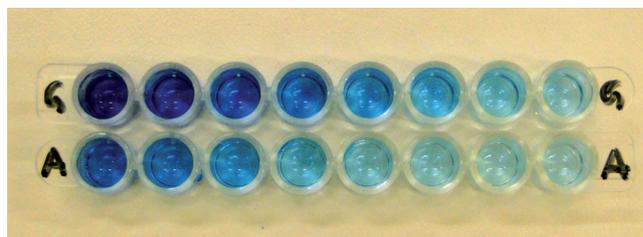


Figura 1: Desenvolvimento de coloração nas amostras de soluções contendo HCG em diferentes condições de armazenamento (G: Geladeira / A: Ambiente).

Diversos fatores podem interferir na estabilidade de solução oral contendo o HCG, dentre estas se destaca o pH, os excipientes, a força iônica e a temperatura. Temperaturas superiores a 25°C podem promover o início de alterações moleculares como a dissociação das subunidades alfa e beta, demonstrando a característica termolábil do HCG (VANEY, 2009), o que pode explicar a diminuição maior na intensidade de cor na amostra armazenada em temperatura ambiente (27°C).



Formulações contendo HCG administrada por via intramuscular, armazenadas em temperatura ambiente ou refrigeradas, demonstram alteração na sua atividade após uma semana após o seu preparo (ASHER, 1973). As formulações avaliadas neste trabalho são para uso oral e, portanto, podem ser armazenadas em geladeira sem perda da estabilidade.

Além disso, o tratamento utilizando HCG para obesidade geralmente ocorre durante 06 semanas, período menor do avaliado neste trabalho sugerindo que a estabilidade dessas amostras não comprometeria os resultados do tratamento.

Trabalhos posteriores sobre a estabilidade de diferentes formas farmacêuticas contendo HCG e avaliação da sua eficácia com correlação de possíveis interferentes devem ser realizados. Análises mais detalhadas da quantificação de HCG como: determinação da absorvância das amostras analisadas e análises cromatográficas de alta resolução poderiam confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, pôde-se observar o resultado das dosagens pelo desenvolvimento de cor durante todo o período avaliado indicando estabilidade das amostras nas duas condições de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a empresa Drogaria Minas Brasil pelo apoio para realização desse experimento, bem como a Universidade Estadual de Montes Claros e a Faculdade Santo Agostinho pelo apoio científico e financeiro.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Nada a declarar

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHER, W.L.; HARPER, H.W. Effect of human chorionic gonadotrophin on weight loss, hunger, and feeling of well-being. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 26: 211-218, 1973.
- BELLUSCIO, D.O. Utility of an Oral Presentation of HCG (Human Choriogonadotropin) for the Management of Obesity: A Double Blind Study. *The Original Internist*, 6: 197-210, 2009.
- BRYMAN, D. Successful weight loss intervention using a modified HCG diet: a retrospective six week analysis. *The Bariatrician*, 25(2): 9-11, 2010
- COLE, L.A. Biological functions of HCG and HCG-related molecules. *Reproductive Biol. and Endocrinol.*, 8:102, 2010.
- COLE, L.A. HCG structure: A logical perspective. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(4): 287-292, 2012.
- FLEIGELMAN, R. Metabolic effects of human chorionic gonadotropin (HCG) in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 135(2): 317-9, 1970.
- GREENWAY, F.L.; BRAY, G.A. Human chorionic gonadotrophin (HCG) in the treatment of obesity-A critical assessment of the Simeons method. *West J Med.*, 127 (6): 461-463, 1977.
- MEDEIROS, S.F.; NORMAN, R.J. Formas moleculares da gonadotrofina coriônica humana: características, ensaios e uso clínico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 28(4): 251-63, 2006.
- POLEC, A.; FEDORCSÁK, P.; ESKILD, A.; TANBO, T.G. The interplay of human chorionic gonadotrophin (HCG) with basic fibroblast growth factor and adipokineson angiogenesis in vitro. *Rev. Placenta*, 35(4):249-53, 2014.
- SAAVEDRA M.S.; FILGUEIRA, E.E.; PESSACQ, M.T.; SCHWEIZER, J.R.; CALCAGNO, M. L.; FENILI, C.A. Formas moleculares de Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG). Impacto em su medición. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.*, 41(1): 27-45, 2004.
- SABINE, G. K. The effect of human chorionic gonadotropin (HCG) in the treatment of obesity by means of the Simeons therapy: a criteria-based meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.*, 40: 237-243, 1995.



STEIN, M.R.; JULIS, R.E.; PECK, C.C.; HINSHAW, W.; SAWICKI, J.E.; DELLER, J.J. JR. Ineffectiveness of human chorionic gonadotropin in weight reduction: a double-blind study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29 (9): 940- 948, 1976

VANEY, S.A.; BELLUSCIO D.O. Pharmacology and Pharmacodynamics of HCG solutions to be administered by the oral sublingual approach. The influence of different excipients and storage procedures. Argent. The Oral HCG Research Center, 2011.