



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**APLICAÇÃO DE *QUALITY BY DESIGN* NO ESTUDO DE PRÉ-
FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DO SULFATO DE
HIDROXICLOROQUINA**

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

Recife

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

**APLICAÇÃO DE *QUALITY BY DESIGN* NO ESTUDO DE PRÉ-
FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DO SULFATO DE
HIDROXICLOROQUINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim

Recife
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F379a Ferraz, Leslie Raphael de Moura.

Aplicação de quality by design no estudo de pré-formulação farmacêutica do sulfato de hidroxiclороquina / Leslie Raphael de Moura Ferraz . – Recife: O autor, 2014.

200 f. : il.; tab.; gráf. ; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui referências e anexos.

1. Hidroxiclороquina. 2. Doenças Reumáticas. 3. Termogravimetria. 4. Varredura diferencial de calorimetria. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-112)

LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ

**APLICAÇÃO DE QUALITY BY DESIGN NO ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 17/02/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Mônica Felts de La Roca Soares (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a. Dr.^a. Ana Cristina Lima Leite

Àqueles que, mesmo depois de tudo, nunca deixaram de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que, de alguma forma, arquitetou muito bem a trajetória da minha vida e me fez um ser humano mais forte, confiante e merecedor de crédito. Obrigado por me mostrar o caminho e as pessoas certas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Pedro Rolim**, por me formar não só como profissional, mas como pessoa também. Sou bastante grato por tudo e fico extremamente satisfeito em admitir que o seu estilo de ensinar é, de fato, válido e proveitoso. Sua integridade, comprometimento e profissionalismo servem de inspiração. A prova disso é que quando alguém pergunta: “-Quem é o teu orientador?”, eu, cheio de orgulho, respondo: “-Prof. Pedro Rolim”.

A minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Larissa Rolim**, que elevou o sentido da palavra “orientação” ao mais alto nível possível. Aprendi contigo o que não se aprende em aulas e livros. Aprendi o *essencial*. MUITÍSSIMO obrigado por se importar, por estar sempre por perto (mesmo que não fisicamente), por passar uma mão na minha cabeça e com a outra me dar uma “tapa da realidade”. Você é, sem sombra de dúvidas, o exemplo de profissional que um dia almejo ser.

A minha irmã **Lilian Raffaele** por sempre ter sido minha fã numero 1. Por se dar por completo sem esperar nada em troca. Por ser transparente, concisa e incentivadora. Por ter comprado uma batalha por mim, por virar às costas aos outros só com o intuito de me ajudar. Te amo.

Àquela parcela da minha família que ainda posso chamar de família. À **Mainha**, por tentar. Por viver tentando. Por ter sempre acreditado em mim. Por ter sido uma batalhadora desde que eu me entendo por gente. Por ter me criado e me formado filho, homem e cidadão. Eu devo tudo a você e, por isso, tudo que eu faço é pra você. À **Tia Zilda** e **Padrinho** por terem se tornado meus pai e mãe quando os meus próprios se demonstraram despreparados para sê-lo. Aos meus primos, em especial **Edilton Jr., Elviva Hatagami, Bruno Beltrão, Janaína e Angélica Ferraz e Fabíola Teixeira**, pela torcida e fraternidade.

A **Arthur Perrier**, por ser um reflexo do que eu quero/preciso ser. Por se tornar um alicerce. Por ser dedicado e saber o que dizer e quando. Por ser meu cúmplice e melhor amigo.

A **Loki**, por todo o trabalho que me dá.

Aos meus amigos, eternos incentivadores, em especial **Adryelle Lins, Jorge Eustáquio, Gustavo Siqueira, Victor Sales, Tobias Neto, Renan Rubens, Messias Victor, Marcondes Bezerra, Matheus Ângelos, James Almeida** e a todos os “meus” *Farmaloucos*.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, minha segunda casa, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por me proporcionar um ambiente de trabalho confortável, digno e cheio de harmonia.

À minha equipe de trabalho, em especial à **Fabiana Licia** que me ensinou o *bê-a-bá* do que é ser um pesquisador, minha eterna Mestra; e a **Ricardo Maia-Jr.**, meu incansável aluno de iniciação científica, por ser tão prestativo e aguentar meus dias de cão.

À **Salvana Costa**, que se tornou uma parceira. Obrigado por se preocupar, por ser tão pura em um meio tão desgastante e competitivo, pelos almoços e caronas, pela ajuda no supino, pela certeza que eu tenho de que, durante o expediente do trabalho, eu tenho risadas garantidas. É sempre com muita satisfação que eu cito: “COSTA et al., 2013). À **Cybelly Marques** por conversar comigo por 2 minutos e me entender, conseguindo tirar de mim mesmo o que eu não queria dizer pra ninguém. Por todo o apoio e força, obrigado.

A família – no sentido mais denotativo da palavra – LTM: **Lariza Darlene, José Lourenço, Cristóvão Rodrigues, Danilo Fontes, Pablo Ataíde, Graziella Marques, Rosali Silva, Keyla Emanuelle, Isabela Amariz, Caio César, Magaly Lyra, Débora Dolores, Talita Atanázio, Tarcyla Andrade** e aos professores **José Lamartine, Mônica Felts e Miracy Muniz** e suas alunas **Amanda Quintas e Camila Melo**.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) que, através do programa institucional de bolsas de Pós-graduação, possibilitou a realização do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a **Nerilin Trajano**, por resolver minha vida em 1 minuto e meio; e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, em especial a **Paulo Germano**.

À bibliotecária **Mônica Uchôa**, pela paciência e auxílio concedidos no ato da deposição legal da dissertação.

Ao Departamento de Física, Departamento de Engenharia Química e ao CETENE pela parceria indispensável para a realização deste trabalho.

E, finalmente, a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos vocês, o meu sincero **muito obrigado!**

RESUMO

Desenvolvido inicialmente como agente antimalárico, o sulfato de hidroxicloroquina (HCQ) é frequentemente utilizado como fármaco antirreumático de ação lenta no tratamento de distúrbios de tecido conectivo. Apesar de ser bastante conhecido na prática clínica, muito pouco é sabido sobre as propriedades físico-químicas do sulfato de HCQ no âmbito da tecnologia farmacêutica. O objetivo do presente estudo foi realizar estudo de pré-formulação com o sulfato de HCQ utilizando o conceito de *Quality by Design* (QbD), como etapa limitante para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. A caracterização da matéria-prima foi realizada através de diferentes técnicas analíticas, a fim de gerar robusta carta de identidade do fármaco. Devido à ausência de monografia específica no compêndio oficial brasileiro, foram desenvolvidos/otimizados dois métodos para doseamento do fármaco: o primeiro, utilizando espectroscopia por absorção na região do ultravioleta, seguido de validação e, o segundo, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Para evidenciar o comportamento térmico do sulfato de HCQ frente a uma mistura dos excipientes, foram utilizadas as técnicas de análise térmica e cálculos dos parâmetros cinéticos. A compatibilidade do fármaco-excipiente foi avaliada através de calorimetria exploratória diferencial, seguida de análises complementares. A etapa inicial de caracterização do sulfato de HCQ forneceu especificações físico-químicas compondo robusta carta de identidade do fármaco, essencial para o desenvolvimento do trabalho. Os métodos analíticos demonstraram-se satisfatórios para todos os critérios preconizados pelas normativas, sendo mais simples rápidos e práticos para a rotina laboratorial. Através da obtenção de cinéticas de degradação dinâmica e isotérmica, a matéria-prima mostrou um prazo de validade estimado de 622 dias, enquanto que a mistura de excipientes avaliada, evidenciou uma interação positiva dos excipientes, sendo observada pelo prolongamento do prazo de validade, estimado em 790 dias. Foi observada incompatibilidade entre o fármaco e o glicolato sódico e a lactose. O presente trabalho apresentou informações relevantes sobre a natureza físico-química do fármaco sulfato de HCQ e forneceu subsídios para desenvolvimento de formas farmacêuticas que o utilizem como insumo farmacêutico ativo. Os resultados foram utilizados na padronização de parâmetros de qualidade para o setor de produção e controle de qualidade de medicamentos.

Palavras-chave: Hidroxicloroquina. Doenças Reumáticas. Termogravimetria. Varredura Diferencial de Calorimetria.

ABSTRACT

Developed originally as an antimalarial agent, the hydroxychloroquine (HCQ) sulfate is often used as a slow-acting anti-rheumatic drug in treating of disorders of connective tissue. Although it is well known in clinical practice, very little is known about the physicochemical properties of HCQ sulfate within the pharmaceutical technology. Therefore, the aim of this work was to perform a pre-formulation study with HCQ sulfate using the concept of Quality by Design (QbD) on the development of dosage forms. The characterization of the raw material took place by means of different techniques, to generate robust identity card of the drug. Due to the absence of specific monograph on Brazilian official compendium, were developed/optimized two methods for quantification of the drug: the first, using absorption spectroscopy in the ultraviolet region with further validation, and the second, using high performance liquid chromatography efficiency. The drug-excipient compatibility was evaluated by differential scanning calorimetry, followed by additional analyzes. To demonstrate the thermal behavior of HCQ sulfate front of a mixture of excipients, thermal analysis techniques and calculation of the kinetic parameters were used. The initial step in the characterization of HCQ sulfate provided physicochemical specifications composing robust identity card of the drug, essential step for the development of the work. The analytical methods have shown to be satisfactory for all criteria established by regulations, being more simple, fast and practical for routine laboratory. By obtaining dynamic and isothermal degradation kinetics, the raw material showed the estimated validity of 622 days, whereas the mixture of excipients evaluated, showed a positive interaction of excipients, being observed by the extension of the validity period, estimated for 790 days. Incompatibility between the drug and sodium glycollate and lactose was observed. This paper presents relevant information on the physicochemical nature of the drug hydroxychloroquine sulfate and provided subsidies for development of dosage forms that use it as an active pharmaceutical ingredient. The results were used in the standardization of quality parameters for the sector of production and quality control of drugs.

Keywords: Hydroxychloroquine. Rheumatic Heart Disease. Thermogravimetry. Calorimetry. Differential Scanning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da hidroxicloroquina base livre com a enumeração dos carbonos.	31
Figura 2. Acometimento da artrite reumatoide sobre a articulação das mãos	35
Figura 3. Fluxograma do algoritmo para o tratamento da artrite reumatoide (MOTA et al., 2011).	42
Figura 4. Retinografia a cores: Mácula em olho de boi (SILVA & SILVA, 2009).	54
Figura 5. Esquema representativo da metodologia de hidrólise degradativa.	64
Figura 6. Esquema representativo da metodologia de oxidação degradativa.	64
Figura 7. Estruturas da hidroxicloroquina, suas impurezas e produtos de degradação (adaptado de Saini & Bansal, 2013).	67
Figura 8. Provável rota degradativa do sulfato de hidroxicloroquina.	67
Figura 9. Curvas típicas dos principais métodos termogravimétricos: (a) isotérmico; (b) Quase isotérmico e (c) dinâmico.	69
Figura 10. Sítios de formação de diastereoisômeros do sulfato de hidroxicloroquina.	72
Figura 11. Árvore decisória para execução do estudo de pré-formulação do sulfato de hidroxicloroquina.	80
Figura 12. Fluxograma para execução do estudo de compatibilidade.	94
Figura 13. (a) Espectro de absorção na região do infravermelho e (b) Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxicloroquina.	101

Figura 14. Espectro de Raman do sulfato de HCQ.....	102
Figura 15. Espectro de massa da HCQ e estrutura química da hidroxiclороquina base livre com enumeração de	104
Figura 16. Comportamento higroscópico do fármaco sulfato de hidroxiclороquina em diferentes condições de umidade relativa do ar.....	106
Figura 17. a) Capilares utilizados no fusiômetro; b) Curva DSC do sulfato de hidroxiclороquina.	108
Figura 18. Difrátograma de raios-X do sulfato de hidroxiclороquina	109
Figura 19. Micrografias de varredura do sulfato de hidroxiclороquina com aumentos de 300 e 750 vezes.	109
Figura 20. Curva TG/DTG do sulfato de hidroxiclороquina.	110
Figura 21. Curva TG/DTG do sulfato de hidroxiclороquina ($\beta = 40\text{ }^{\circ}/\text{min}$)	111
Figura 22. a) Repartição granulométrica; (b) tamanho médio de partícula do sulfato de hidroxiclороquina.	115
Figura 23. Gráficos de superfície-resposta correlacionando o fator de cauda do pico resposta da HCQ ao fluxo e composição da fase móvel bem como a temperatura da coluna cromatográfica.	118
Figura 24. Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxiclороquina.	120
Figura 25. Gráfico de Pareto	123
Figura 26. Varreduras espectrofotométricas da HCQ isolada, contaminada com excipientes e da forma farmacêutica comprimido Plaquinol®.	124

Figura 27. a) Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade, valor de r^2 e equação da reta b) Respectivo gráfico de dispersão	126
Figura 28. Comparação entre o sulfato de hidroxiclороquina e o seu resíduo após ser submetido à condição isothermal na temperatura de 300°C: a) Espectro de infravermelho e b) Difração de raios-X.	130
Figura 29. DSC-fotovisual do sulfato de hidroxiclороquina.	131
Figura 30. Pirograma do sulfato de HCQ (temperatura de 300°C)	131
Figura 31. Curvas TG do sulfato de hidroxiclороquina obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (2,5, 5, 10, 20 e 40°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa.	134
Figura 32. Plotagem do gráfico $G(x)$ vs. <i>Tempo Reduzido</i> (min) para uma reação de 1ª ordem e os valores de energia de ativação (E_a) e fator de frequência (A).	135
Figura 33. Curvas isotérmicas do sulfato de hidroxiclороquina em diferentes temperaturas mantidas constantes em atmosfera de nitrogênio (100 mL.min ⁻¹).	137
Figura 34. Gráfico de Arrhenius ($\ln t$ vs. $1/K$) para a decomposição térmica do sulfato de hidroxiclороquina matéria-prima.	138
Figura 35. Curva DSC, TG e DTG do sulfato de hidroxiclороquina ($\beta=10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$)	140
Figura 36. DSC-fotovisual do comprimido Plaquinol [®] à base do sulfato de hidroxiclороquina.	141
Figura 37. Plotagem do gráfico $G(x)$ vs. <i>Tempo Reduzido</i> (min) para uma reação de 1ª ordem e os valores de energia de ativação (E_a) e fator de frequência (A).	142
Figura 38. Curvas isotérmicas do sulfato de hidroxiclороquina na forma farmacêutica comprimido em diferentes temperaturas mantidas constantes em atmosfera de nitrogênio (100 mL.min ⁻¹).	143

Figura 39. Gráfico de Arrhenius ($\ln t$ vs. $1.K^{-1}$) para a decomposição térmica do sulfato de hidroxiclороquina na forma farmacêutica..... 144

Figura 40. Espectros de infravermelho do sulfato de hidroxiclороquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico. 149

Figura 41. Difrátogramas do sulfato de hidroxiclороquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico. 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão sistemática de evidência da eficácia do sulfato de hidroxicloroquina no tratamento da artrite reumatoide e lúpus eritematoso (adaptado de Olsen, 2013).	33
Tabela 2. Diagnóstico diferencial das artrites (adaptado de MOTA et al., 2011).	37
Tabela 3. Novos critérios classificatórios para artrite reumatoide (adaptado de MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2010).	39
Tabela 4. Limites dos produtos de degradação expressos de acordo com a porcentagem de fármaco.	65
Tabela 5. Organização do planejamento fatorial 2^2	89
Tabela 6. Correlação entre as bandas, tipos de vibração da ligação e seus respectivos grupos funcionais, obtido do espectrograma de infravermelho do sulfato de hidroxicloroquina.	100
Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H para o sulfato de HCQ dissolvido em água deuterada (D_2O).....	102
Tabela 8. Fragmentos da hidroxicloroquina base livre obtidos através de +ESI- MS_2	104
Tabela 9. Solubilidade do sulfato de hidroxicloroquina em diferentes solventes e pH's.....	105
Tabela 10. Resultados experimentais dos solventes onde o sulfato de hidroxicloroquina se apresentou pouco solúvel.....	112
Tabela 11. Porcentagem de sulfato de hidroxicloroquina dissolvida em soluções aquosas em diferentes pH's.....	112
Tabela 12. Eficiência de dissolução para o sulfato de HCQ nos tempos 5 e 30 minutos.....	113

Tabela 13. Parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio na determinação de superfície específica e tamanho de poro do sulfato de hidroxiclороquina.	116
Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 3^3	117
Tabela 15. Comparação entre os resultados obtidos das análises realizadas com as diferentes formas de preparação de amostra e tratamento estatístico presumindo diferentes variâncias	121
Tabela 16. Matriz do planejamento fatorial 2^2	122
Tabela 17. Influência dos fatores e da interação entre eles	122
Tabela 18. Resultados obtidos para as análises do parâmetro seletividade.....	125
Tabela 19. Resultados obtidos para as análises do parâmetro precisão e tratamento estatístico através de coeficiente de variância e ANOVA <i>one-way</i> e ANOVA <i>two-way</i>	126
Tabela 20. Resultados obtidos para as análises do parâmetro exatidão e tratamento estatístico teste <i>t-Student</i> presumindo variâncias equivalentes.	127
Tabela 21. Resultados obtidos para as análises do parâmetro robustez e tratamento estatístico através de ANOVA <i>One-Way</i>	127
Tabela 22. Resultados obtidos para o teor de HCQ na matéria-prima e comprimidos e a tratamento estatístico teste <i>t-Student</i>	128
Tabela 23. Produtos de degradação térmica do sulfato de hidroxiclороquina obtidos através de pirólise-CG/MS.	132
Tabela 24. Valores dos r^2 obtidos para a regressão linear de cada ordem de reação (0, 1 e 2) para cada etapa degradativa e seus respectivos valores dos parâmetros cinéticos.	135
Tabela 25. Rampa de aquecimento utilizada para obtenção temperaturas isotérmicas constantes.	136

Tabela 26. Determinação da ordem de reação da cinética de degradação do sulfato de hidroxiclороquina sobre condições isotermais	137
Tabela 27. Valores dos r^2 obtidos para a regressão linear de cada ordem de reação (0, 1, 2, 3, 4 e 5) para o segundo evento de degradação e seus respectivos valores dos parâmetros cinéticos.	142
Tabela 28. Temperatura inicial (T_{onset}), temperatura do pico (T_{pico}) e temperatura final (T_{endset}) do evento de fusão, variação da entalpia (ΔH), Temperatura de degradação (T_{deg}) e perda de Massa do sulfato de HCQ e das MB.	145
Tabela 29. Resultados obtidos para os cálculos dos parâmetros cinéticos do sulfato de hidroxiclороquina isolado e das misturas binárias entre o fármaco e o glicolato de amido sódico a lactose.	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fator de Frequência (Fator de Arrhenius)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ACPA	Anticorpos Antiproteínas e Peptídeos Citrulinados
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
Anti-CCP	Anticorpos Anti-peptídeos Citrulinados Cíclicos (anti-CCP)
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
AR	Artrite Reumatoide
ATR	Reflectância Total Atenuada
BDCQ	Bisdesetilcloroquina
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP	Consulta pública
CQ	Cloroquina
DATAAN	(+)-di-O-acetil-L-tartárico
DCQ	Desetilcloroquina
DHCQ	Desetilhidroxicloroquina
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Diferencial
DR-X	Difração de Raios-X
<i>Ea</i>	Energia de Ativação
ED	Eficiência de dissolução
EE	Estudo de Estabilidade
EM	Espectro de Massa
EUA	Estados Unidos da América
FDA	United States Food and Drugs Administration
FR	Fator Reumatoide
GAS	Glicolato de amido sódico
GC	Glicocorticoides

G6FD	Glicose-6-fostato Desidrogenase
HCQ	Hidroxicloroquina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	Internation Conference on Harmonization
IFA	Insumos Farmacêuticos Ativos
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-6	Interleucina-6
IMP	Impurezas
IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
IV-TF	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>
LA	Lactose
LC-PDA	Cromatografia Líquida acoplada a Detector de Arranjo Diodo
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteínas de Baixa-Densidade
LE	Lúpus eritematoso
LED	Lúpus eritematoso discoide
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LQ	Limite de quantificação
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MB	Mistura Binária
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass Spectrum</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIE	Métodos indicativos de estabilidade
MTX	Metotrexato
n	Ordem de Reação
NCQMC	Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos
PCR	Proteína C Reativa
PD	Produtos de degradação
PEG	Polietilenoglicol

pH	Potencial Hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
QbD	Quality by Design
rac-HCQ	mistura racêmica de Hidrocicloroquina
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
R-HCQ	Enantiômero R da Hidroxicloroquina
R-CQ	Enantiômero R da Cloroquina
S-HCQ	Enantiômero S da Hidroxicloroquina
S-CQ	Enantiômero S da Cloroquina
SL	Sulfalazina
SS	Síndrome de Sjögren
TG	Termogravimetria
TOF	Time of Flying
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível
VHS	Velocidade de Hemossedimentação.
ZDV	Zidovudina

LISTA DE SÍMBOLOS

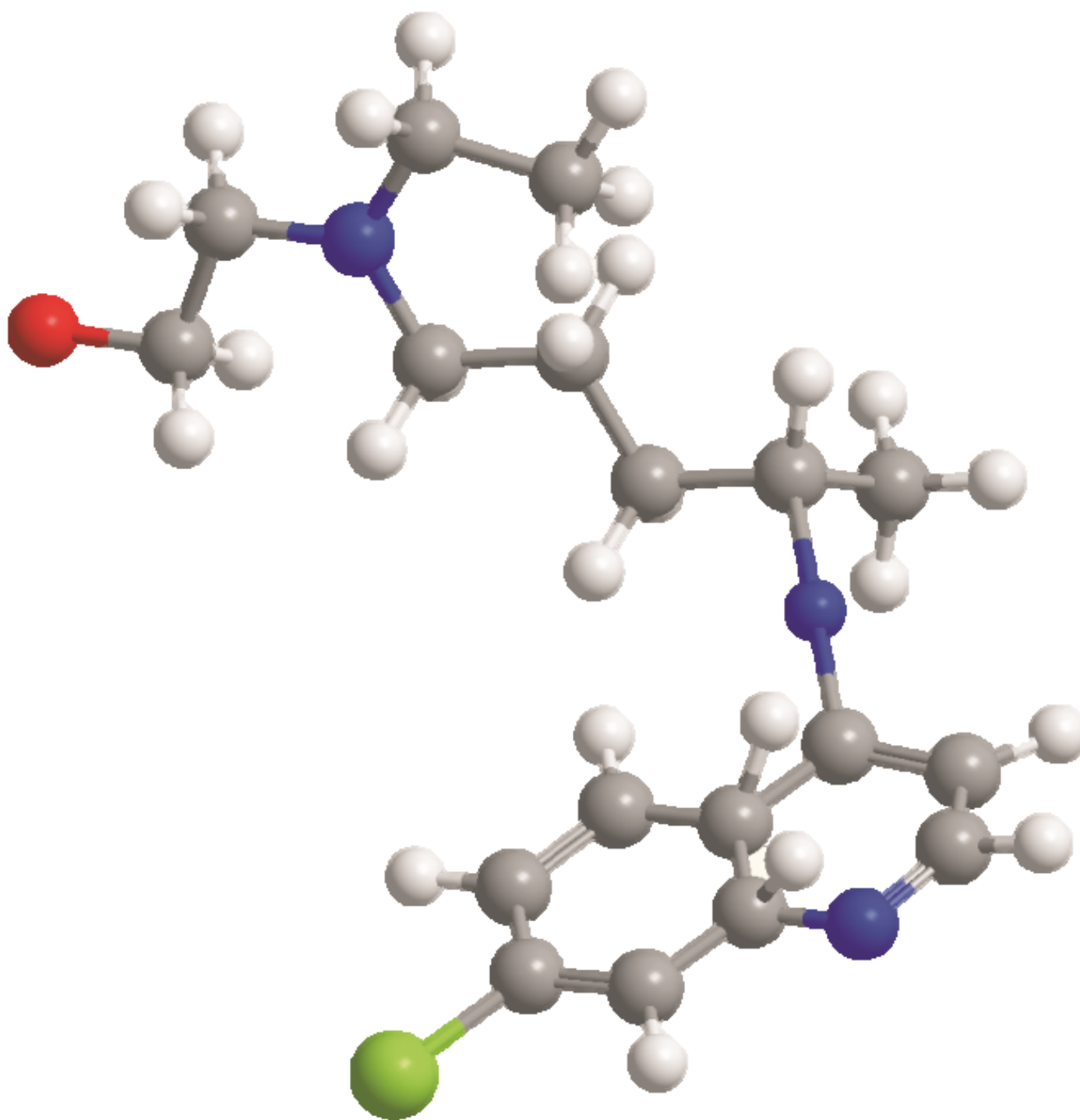
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/dia	Miligrama por dia
%	Porcentagem
g	Grama
g/L	Grama por Litro
°C	Graus Celsius
n°	Número
k	constante de degradação de fármacos
T ₀	Temperatura inicial
T	Temperatura analisada
t	Tempo
K _t	Determinação da estabilidade
C	concentração
K	Constante de Velocidade Cinética
ln C	logarítmo neperiano da concentração
1/C	Inverso da concentração
nm	Nanômetro
cm	Centímetro
mW	MiliWatts
αD	rotação específica
m/z	massa/carga
mm	Milímetro
m	metro
U%	Porcentagem de água adsorvida
O _s	Peso do pesa-filtro contendo a amostra após da dessecação
P _u	Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação
P _a	Peso da amostra
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
mL/hora	Mililitro por hora
dAP	Densidades aparente

dCP	Densidade compactação
IH	Índice de Hausner
IC	Índice de Carr
M	Molar
w/m ² /hora	Watts por metro quadrado por hora
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
Pág	Página
min	Minutos
p/p	Relação concentração Peso - peso
Ti	temperatura inicial de fusão
ppm	Partes por Milhão
g/mol	Gramas por mol
m/z	Massa/carga
Hz	Hertz
αD	rotação específica
ASC	área sob a curva do tempo
ATG	a área total do gráfico
C	Quantidade residual de fármaco
Co	Quantidade inicial
K	Constante de velocidade cnética
KJ/mol ⁻¹	Kilo Joules por mol
J.g ⁻¹	Joules por grama
Å	Angstrom
cm ³ /g	Centímetros cúbicos por grama
m ² /g	Metros quadrados por grama
°C.min ⁻¹	Graus Celsius por minuto
ml.min ⁻¹	Mililitro por minuto
MHz	Megahertz
eV	Eletronvolt
kV	Kilovolt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Sulfato de hidroxiclороquina.....	31
3.2 Quality by design.....	74
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE APLICAÇÃO DE <i>QUALITY BY DESIGN</i> NOS ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	77
4.1.3 Caracterização a nível molecular.....	7880
4.1.4 Caracterização a nível de partículas.....	78
4.1.5 Caracterização a nível de aglomerado de partículas.....	83
4.1.5 Caracterização a nível de teor de água.....	7984
4.1.6 Determinação de higroscopicidade.....	81
4.1.7 Desenvolvimento e otimização de método analítico para doseamento do fármaco	815
4.2 <i>QUALITY BY DESIGN</i> NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA DOSEAMENTO DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA.....	87
4.2.1 Princípio do método.....	88
4.2.2 Preparo da solução-amostra.....	89
4.2.3 Preparo da curva de calibração.....	89
4.2.4 Especificidade/Seletividade.....	90
4.2.5 Robustez.....	91
4.2.6 Linearidade.....	91
4.2.7 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	91
4.2.8 Precisão.....	92
4.2.7 Exatidão.....	92
4.2.8 Aplicação do método.....	92
4.3 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS.....	93
4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA EXERCIDA POR UMA MISTURA DE EXCIPIENTES SOBRE O SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA EM UMA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO ATRAVÉS DE ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	95
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE APLICAÇÃO DE <i>QUALITY BY DESIGN</i> NOS ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	99
5.2 <i>QUALITY BY DESIGN</i> NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA DOSEAMENTO DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA	120
5.2.1 Preparo da Amostra	121
5.2.2 Planejamento fatorial 2 ² para otimização do método	121
5.2.3 Validação do Método.....	123
5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA EXERCIDA POR UMA MISTURA DE EXCIPIENTES SOBRE O SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA EM UMA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO ATRAVÉS DE ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA	128
5.4 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS	144
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	153
REFERÊNCIAS	156
ANEXOS	192



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Para desenvolver um medicamento eficaz e seguro, é preciso ter amplo conhecimento sobre as propriedades físico-químicas do fármaco e dos adjuvantes farmacêuticos. Durante a etapa produtiva de produtos farmacêuticos, a caracterização do insumo farmacêutico ativo deve ser o primeiro passo a ser executado. As informações obtidas por meio desta prática devem fornecer os subsídios necessários para o delineamento racional de medicamentos. Esta etapa de coleta de dados é conhecida como pré-formulação e é bastante importante para a confecção da carta de identidade do fármaco (NERY et al., 2008; SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

A caracterização é etapa essencial do estudo de pré-formulação. Recentemente, ela vem sendo associada ao conceito de *Quality by Design (QbD)* na área farmacêutica, uma abordagem sistemática, científica e pró-ativa para o desenvolvimento, compreensão e controle sobre produtos e processos. O *QbD* foi descrito pela primeira vez por Juran & Godfrei (1998) e aplicado principalmente na indústria automotiva. A premissa fundamental do *QbD* é o delineamento da qualidade por meio de uma estratégia de otimização visando estabelecer completa compreensão da resposta do sistema de qualidade para determinadas variáveis. Na área analítica e de pesquisa científica o *QbD* aplica-se, principalmente, no *Design of Experiments (DoE)* (BARKER, 2005; YU, 2008; ICH, 2009).

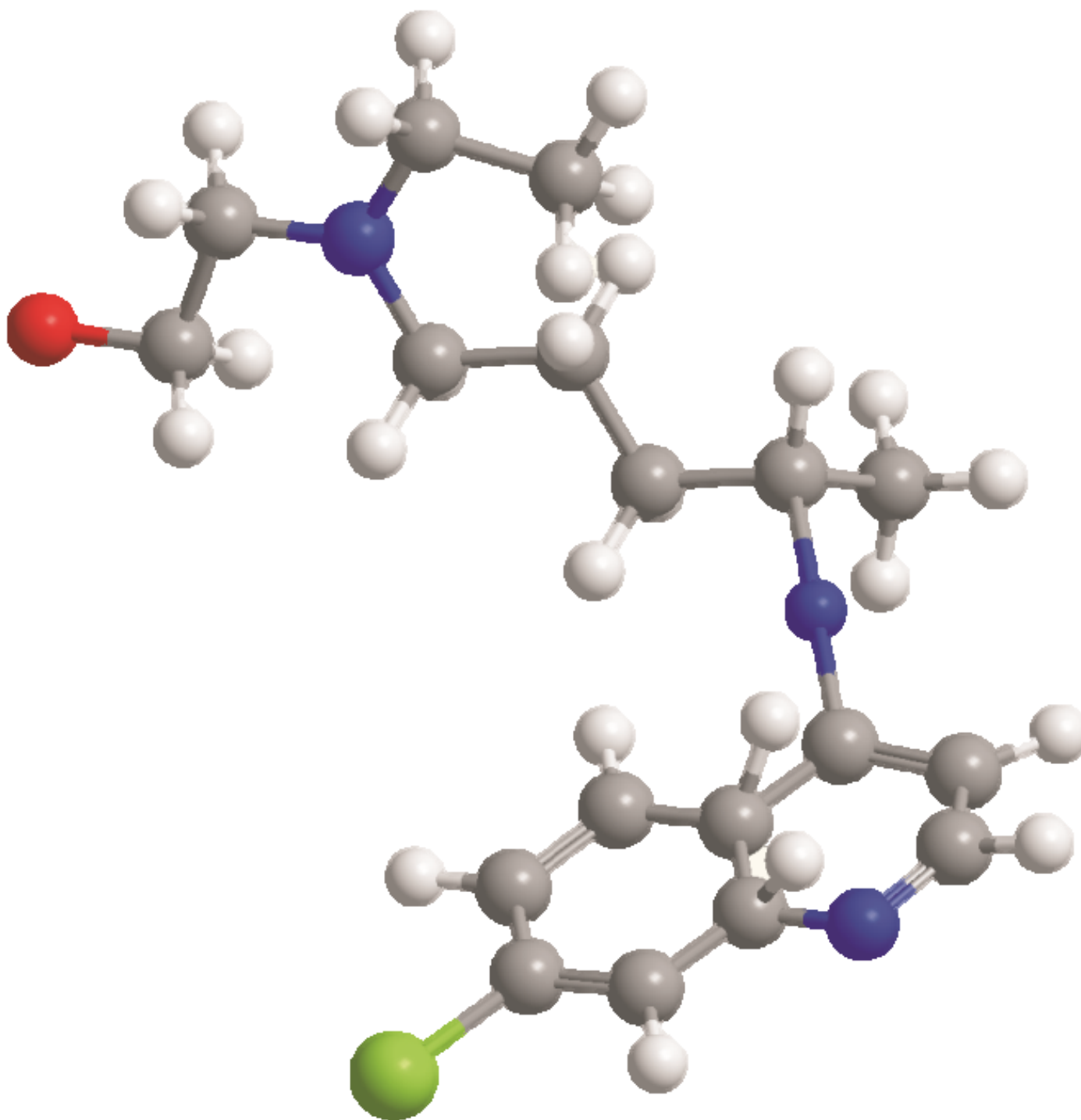
O sulfato de hidroxicloroquina (HCQ), desenvolvido inicialmente como agente antimalárico, é eficaz como droga modificadora do curso da doença em enfermidades autoimunes, tais como: artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico. (MACKENZIE, 1983; OLSEN, SCHLEICH & KARP, 2013).

No tratamento da AR, o sulfato de HCQ é geralmente utilizado em associação a outros dois medicamentos: metotrexato e sulfalazina. Como monoterapia, o sulfato de HCQ é indicado apenas quando em casos precoces da doença ou quando a doença tem baixo ou nenhum potencial erosivo de articulações (MORELAND, 2012; O'DELL et al., 2002).

Entretanto, nos serviços de saúde público e privado, a terapia associativa traz consigo: a severidade dos efeitos colaterais e o elevado custo do tratamento com o metotrexato, considerados como entraves à eficácia do tratamento. Neste contexto, a aplicação da tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de alternativas terapêuticas simples, de custo reduzido e eficácia comprovada, pode aumentar a adesão do paciente ao tratamento (MOTA et al., 2012).

Então, afim de propor tratamento alternativo para AR, como a obtenção de associações em dose fixa, deve ser realizada a elaboração da carta de identidade do fármaco, através de sua caracterização físico-química e de estudos preditivos de sua estabilidade na forma sólida. Esse fato, aliado ao desenvolvimento de métodos analíticos de quantificação do sulfato de HCQ, fornecem os subsídios necessários para o desenvolvimento racional de medicamentos.

Este trabalho tem por objetivo realizar a caracterização físico-química do sulfato de hidroxicloroquina, através da aplicação do conceito *Quality by Design*, como etapa de um estudo de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas sólidas.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos que norteiam o presente trabalho estão descritos abaixo, classificando-os em geral e específicos.

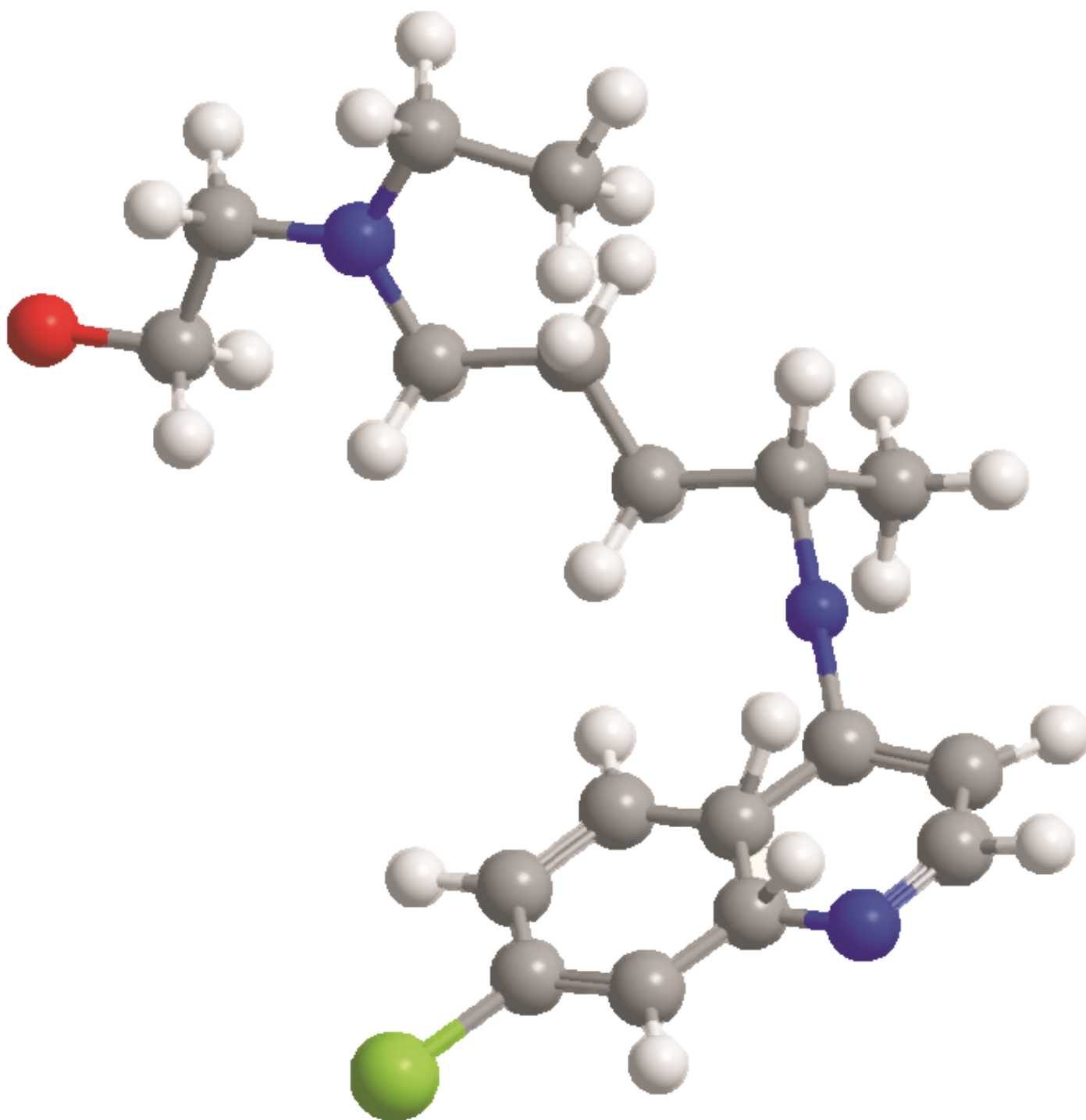
2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização físico-química do sulfato de hidroxiclороquina, através da aplicação do conceito *Quality by Design*, como etapa de um estudo de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas sólidas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar robusta carta de identidade do sulfato de hidroxiclороquina através de: IV-TF, RAMAN, UV, RMN¹³C e RMN¹H, EM, MEV, DR-X, análise térmica (TG/DTG, DSC, DSC-fotovisual), pirólise analítica, polarimetria, determinação de água e umidade residual, determinação de ponto de fusão, ensaio de solubilidade semi-quantitativo e quantitativo, determinação de área superficial, estudos de dissolução, definição das propriedades reológicas, análise granulométrica, determinação do perfil higroscópico;
- ✓ Otimizar método analítico da Farmacopeia Americana – por apresentar-se não reprodutível – para doseamento do sulfato de HCQ por CLAE-DAD, através de aplicação do conceito de *QbD*;
- ✓ Desenvolver, otimizar e validar inédito método analítico para doseamento do sulfato de HCQ por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis;
- ✓ Evidenciar o comportamento térmico do sulfato de HCQ, com ênfase nas faixas de fusão e degradação, através de TG/DTG e DSC;
- ✓ Evidenciar o principal evento de degradação térmica do sulfato de HCQ através de IV-TF, DR-X e pirólise analítica;
- ✓ Realizar o estudo da cinética de degradação através de modelos não-isotérmicos e isotérmicos, da matéria-prima e do comprimido à base do sulfato de HCQ;
- ✓ Realizar estudo de compatibilidade entre o sulfato de HCQ e excipientes comumente utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas, através de análise térmica e técnicas complementares: IV-TF, DR-X e estudo da cinética de degradação;

- ✓ Avaliar a influência exercida por uma mistura de excipientes sobre o sulfato de HCQ incorporado em uma forma farmacêutica, tendo como referência o Plaquinol[®].



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

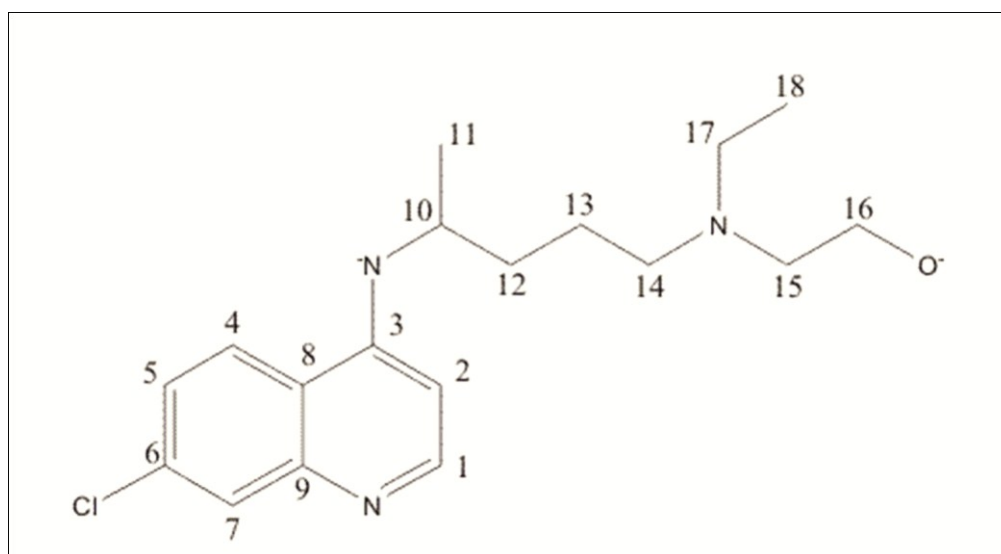
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O embasamento teórico, que diz respeito ao sulfato de hidroxicloroquina e as suas principais indicações clínicas, está disposto a seguir.

3.1 Sulfato de hidroxicloroquina

Desenvolvido inicialmente como agente antimalárico, o sulfato de hidroxicloroquina (HCQ) – quimicamente (7-cloro-4-[4-[N-etil-N-(2-hidroxi-1-etil)-amino]-1-metilbutilamino]-quinolina sulfato (figura 1) – é frequentemente utilizado como fármaco antirreumático de ação lenta no tratamento de distúrbios de tecido conectivo (OLSEN et al., 2013; McLACHLAN et al, 1993; TETT, 1989).

Figura 1. Estrutura química da hidroxicloroquina base livre com a enumeração dos carbonos.



Durante a 2ª Guerra Mundial, ocorreu um extenso programa de cooperação para a pesquisa de antimaláricos nos Estados Unidos. Nessa época, a quinacrina era largamente utilizada pelo exército norte-americano para a profilaxia da malária. Paralelamente, estudos sugeriram possível eficácia em condições reumatológicas da quinacrina e seus derivados. Em meados da década de 50, o sulfato de HCQ mostrou perfil de utilização mais satisfatório devido a menor toxicidade ocular, comparada com a cloroquina. Teve-se aí a base das informações sobre a utilização desses compostos como agente terapêutico para artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) e discoide (LED) (OLSEN et al., 2013;

MORELAND et al., 2012; LEE et al., 2011; O'DELL et al., 2002; GASS, 1997; WEINBERG & D'AMICO, 1994).

A semelhança entre essas substâncias reside no núcleo farmacóforo quinolina. Este tem história longa e bem sucedida como agente antimalárico e antituberculose. Seus derivados têm exibido várias atividades biológicas, como: ação antivírus sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV), antifúngica, antibacteriana e leishmanicida. Entre os compostos oriundos da quinolina, a classe das 4-amino-7-cloro quinolinas continua a ser fármaco de primeira escolha em doenças como malária. A seleção desse núcleo é baseada na sua excelente eficácia clínica, baixa toxicidade, síntese barata e facilidade de administração (KAUR et al., 2010; NAYYAR et al., 2006; RIDLEY, 1998; STREKOWSKI et al., 1991).

A continuidade dos estudos com drogas antimaláricas dá-se pelo crescente aumento da resistência parasitária a medicamentos contendo quinolinas sintéticas, como o sulfato de HCQ (EGAN et al., 2001).

A HCQ é um análogo da cloroquina (CQ) no qual um dos substituintes *N*-etil da cloroquina é β -hidroxilado. Como antimalárico, a HCQ é significativamente eficaz contra a forma eritrocítica dos agentes etiológicos da malária: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, além de grande parte das cepas do *Plasmodium falciparum*. Entretanto, recentemente vem sendo observada uma certa resistência ao *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistente, além de casos de resistência contra cepas de *Plasmodium vivax*. E, apesar de ser utilizada há muito tempo nesse tipo de terapêutica, não se conhece seu exato mecanismo de ação (SEMENIUK et al., 2008; SHAPIRO & GOLDBERG, 2006).

Recentemente, a HCQ têm sido utilizada como fármaco secundário no tratamento de uma variedade de doenças crônicas. Assim, são administrados em conjunto com outros agentes, resultando em eficácia clínica de doenças como: artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus eritematoso discoide (LED), sarcoidose, síndrome de Sjögren (SS) e doenças de fotossensibilidade (SHAPIRO & GOLDBERG, 2006).

Possui eficácia similar à observada com outros fármacos antirreumáticos modificadores da doença, inclusive a própria CQ. Resultados obtidos demonstraram 60-80% de melhora em pacientes adultos acometidos com a doença e tratados com HCQ (ADAMS et al., 1983; MAINLAND & SUTCLIFFE, 1962; HAMILTON & SCOTT, 1962; KERSLEY & PALIN, 1959).

O tratamento de doenças autoimunes com antimaláricos tem sido senso comum por mais de meio século. Muitos estudos de longo prazo evidenciaram melhores resultados em termos de danos a órgãos e de sobrevida global dos pacientes que recebem estes

medicamentos. Ao longo das últimas duas décadas, mais dados vêm sendo acumulados sobre os efeitos sistêmicos do sulfato de HCQ, expandindo os usos potenciais dessa medicação em diferentes classes terapêuticas (OLSEN et al., 2013).

O sulfato de HCQ traz benefícios em longo prazo no tratamento do LES e da AR e tornou-se um componente padrão de terapia para pacientes com estas doenças. A Tabela 1 traz um resumo sistemático da eficácia do tratamento com sulfato de HCQ sobre as manifestações clínicas das principais enfermidades onde o uso de fármaco é recomendado.

Tabela 1. Revisão sistemática de evidência da eficácia do sulfato de hidroxycloquina no tratamento da artrite reumatoide e lúpus eritematoso (adaptado de Olsen, 2013).

Enfermidade	Avaliação da eficácia	Tipo de evidência	Referência
Artrite reumatoide	Contagem de inchaço das juntas e dor;	Revisão de literatura sistemática;	GAUJOUX-VIALA et al., 2010
	Índices articulares;	Ensaio clínico controlado, duplo-cego;	PAVELKA et al., 1989
	Dor e sensibilidade articulares;	Ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego;	NUVER-ZWART et al., 1989
Lúpus eritematoso sistemático	Frequência de crises;	Ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego, envolvendo retirada da terapia;	THE CANADIAN HCQ STUDY GROUP, 1991
	Falha de órgão;	Estudo de coorte longitudinal; estudo de caso-controle;	COSTEDOAT-CHALUMEAU et al. 2010; FESSLER et al., 2013
	Sobrevivência;	Análise de coorte prospectiva; Análise de coorte longitudinal;	RUIZ-IRASTORZA et al., 2006; SHINJO et al., 2010
	Início tardio da doença;	Estudo de caso-controle aninhado;	JAMES et al., 2007
	Manifestações cutâneas;	Análise de coorte prospectiva;	FRANCÈS et al., 2012
	Prevalência de nova doença renal;	Análise de coorte prospectiva;	SHINJO et al., 2010
	Glomerulonefrite;	Análise de coorte longitudinal;	PONS-ESTEL et al., 2009
	Remissão renal completa para nefropatia membranosa.	Análise de coorte retrospectiva;	KASITANON et al., 2006

O uso do fármaco em questão é seguro durante a gravidez, pois a molécula de HCQ é grande demais para atravessar a barreira placentária. Estudos transversais sugerem que é

possível reduzir o risco de anormalidades cardíacas fetais em mães com auto anticorpos contra antígenos que participam dos processos que envolvem a RNA-polimerase (IZMIRLY et al., 2012; IZMIRLY et al., 2010; LEVY, 2005; COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2009).

3.1.1 Aspectos clínicos e terapêuticos da artrite reumatoide

Classificada como uma doença autoimune de etiologia desconhecida, a AR acomete cerca de 0,5-1% da população mundial adulta, não havendo restrição étnica. Caracteriza-se por ser doença inflamatória sistêmica, crônica e progressiva (LEE & WEINBLATT, 2001; ALARCÓN, 1995).

No Brasil, Marques-Neto e colaboradores (1993), em estudo multicêntrico, evidenciaram a prevalência da enfermidade em até 1% da população adulta brasileira, correspondente a 1.300.000 pessoas acometidas (LEE & WEINBLATT, 2001; ALARCÓN, 1995).

Há predomínio no sexo feminino (2 a 3 vezes em relação ao sexo masculino), ocorrendo, sobretudo, em pacientes entre a quarta e sexta década de vida, embora haja registro em todas as faixas etárias (SILMAN & PEARSON, 2002; LEE & WEINBLATT, 2001).

A doença atinge preferencialmente a membrana sinovial das articulações, podendo levar à destruição óssea e cartilaginosa. É comum o acometimento simétrico das pequenas e das grandes articulações, com maior frequência de envolvimento das mãos e dos pés (Figura 2).

Tal dano, muitas vezes irreversível, acarreta altos custos para o indivíduo acometido pela enfermidade. Além disso, os portadores da doença encontram-se em idade produtiva de trabalho, o que pode determinar importante limitação na capacidade funcional e perda de capacidade laboral. Assim, custos indiretos relacionados a esse contexto devem ser incorporados às análises de farmacoeconomia (SMOLEN et al., 2010; VERSTABPEN et al., 2010; SOKKA, 2003; CHEHATA et al., 2001; LEE & WEINBLATT, 2001; EMERY & SALMON, 1995).

Figura 2. Acometimento da artrite reumatoide sobre a articulação das mãos



Fonte: <http://www.drbyma.com/394/>

Fato interessante evidenciado por Mota e colaboradores (2010) é que as características demográficas e clínicas da AR são variáveis de acordo com a população acometida. Assim, há certa dificuldade na normatização da conduta clínica brasileira da doença, uma vez que a maior parte das informações disponíveis provém de consensos realizados pela Europa e Estados Unidos, sendo poucos os estudos realizados na população brasileira (MOTA et al., 2010; SMOLEN et al., 2010; SAAG et al., 2008; LOUZADA-JUNIOR et al., 2007).

A elaboração de um consenso nacional e/ou internacional visa à avaliação dos custos e a alocação de recursos para o diagnóstico e tratamento da doença, adaptados à realidade do país onde se deseja implantar a terapia.

Mota e colaboradores (2011) publicaram o documento nacional mais atualizado no que tange às recomendações internacionalmente harmonizadas para o tratamento da AR. O enfoque no diagnóstico da doença leva em consideração o peculiar aspecto da realidade socioeconômica brasileira. Baseado em uma ampla revisão da literatura e nas opiniões de especialistas membros da Comissão de Artrite Reumatoide da Sociedade Brasileira de Reumatologia, foi publicado o Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide (MOTA et al., 2011).

O diagnóstico de AR deve ser estabelecido por meio de achados clínicos e exames complementares. Nenhum teste isolado, seja laboratorial, de imagem ou histopatológico, é capaz de confirmar o diagnóstico. Logo, se faz necessário o diagnóstico diferencial, uma vez que diversas doenças podem ser associadas à artrite, conforme mostra a tabela 2 (MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2010).

Quando a AR se apresenta em sua forma bem definida, com todos os achados típicos, o diagnóstico é de fácil elucidação. Já na fase inicial, pode ser difícil, uma vez que alterações sorológicas e radiográficas características muitas vezes estão ausentes. Sugere-se que esse impasse ocorra por se tratar de uma doença sistêmica. Sintomas gerais como: febre, astenia, fadiga, mialgia e perda ponderal podem preceder ou acompanhar o início das manifestações articulares (MOTA et al., 2011; DIXON & SIMMONS, 2005).

Visando facilitar a elucidação do diagnóstico da doença, exames laboratoriais podem ser requisitados. Na fase aguda, os marcadores laboratoriais mais utilizados para avaliação da atividade da AR são: provas de atividade inflamatória, velocidade de hemossedimentação e dosagem da proteína C reativa. No entanto, tais exames não são específicos, podendo variar conforme idade e sexo, por exemplo. Em contrapartida, a pesquisa de determinados anticorpos mostrou-se bastante específica. Dentre os potenciais marcadores de diagnóstico da AR estão: o fator reumatoide (FR) e diversos anticorpos antiproteínas e peptídeos citrulinados, incluindo os anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) (MOTA et al., 2009; VISSER, 2005; DEVLIN, 1997).

Pesquisas mostram a existência do rastreamento genético como medidas de diagnóstico e prognóstico. Inúmeros marcadores genéticos foram descritos em associação com a ocorrência da AR. No entanto, somente a pesquisa dos alelos HLA-DRB1 e dos genes PTPN22 são bem evidenciadas (KLARESKOG, CATRINA & PAGET, 2009).

Método de imagens também são ferramentas que podem ser utilizadas no auxílio do diagnóstico e na manutenção da conduta clínica da AR. Os achados radiográficos comuns, ultrassonografias e a ressonância magnética são métodos indicados. Estes apresentam vantagens e desvantagens, como em relação ao custo ou eficácia e, portanto, devem ser analisados individualmente visando melhor custo-benefício e relação satisfatória entre paciente, profissionais de saúde e ambiente hospitalar (MOTA et al., 2011).

Tabela 2. Diagnóstico diferencial das artrites (adaptado de MOTA et al., 2011).

Grupo de doenças	Doenças
Infecções	Virais (dengue, VIH, parvovírus, citomegalovírus, vírus da hepatite); bacterianas (<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i>); fúngico;
Espondiloartrites	Artrites reáticas (Chlamydia, Salmonella), espondilite anquilosante, artrite psoriásica, artrites enteropáticas;
Doenças reumáticas sistêmicas	Lúpus eritematoso sistêmico, polimiosite/dermatomiosite, esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, vasculite sistêmicas;
Artrites microcristalinas	Gota, doenças por depósito de cristal de pirofosfato de cálcio;
Doenças endócrinas	Hipotireoidismo e hipertireoidismo
Doenças neoplásicas	Doença neoplásica metastática, linfoma, síndrome paraneoplásicas;
Outras	Osteoartrite, hemocromatose, angioedema, sarcoidose, doença do soro.

As manifestações clínicas da AR podem ser divididas em articulares e extra-articulares. As manifestações articulares podem ser reversíveis em sua fase inicial. Quando há destruição articular, tais condições são irreversíveis. Isso ocorre devido às alterações causadas pela sinovite persistente; destruição óssea e cartilaginosa; imobilização e alterações musculares, tendinosas e ligamentares (MOTA et al., 2011; WOOLF, 2003).

As manifestações extra-articulares mais frequentes incluem: quadros cutâneos; oculares; pleuropulmonares; cardíacos; hematológicos; neurológicos e osteometabólicos. Essas são mais observadas em pacientes com doença grave e poliarticular, com nódulos reumatoides e com sorologia positiva para FR e/ou anti-CCP (GOELDNER et al., 2011; TURESSON et al., 2007).

As principais queixas clínicas são: dor, inchaço e limitação dos movimentos das articulações acometidas. Ao exame físico, observa-se presença de dor, aumento de volume

das articulações, derrame intra-articular, calor e, eventualmente, rubor. Nas articulações profundas, como nos quadris e ombros, esses achados podem não ser tão evidentes. São características da artrite as seguintes condições: inflamação da sinóvia (sinovite) – que pode acometer qualquer uma das articulações diartrodiais do corpo –, acometimento poliarticular, artrite em mãos e punhos, artrite simétrica, artrite cumulativa ou somativa e rigidez matinal (MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2010; WOOLF, 2003).

Em relação ao consenso brasileiro, este se encontra em consonância com a última atualização dos critérios de classificação da AR, uma iniciativa da parceria entre o Colégio Americano de Reumatologia e o Comitê Executivo da Liga Europeia Contra o Reumatismo. O *2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria* traz nova abordagem com específica ênfase na identificação de pacientes com duração relativamente curta dos sintomas. Estes poderiam ser beneficiados, por exemplo, com a entrada em ensaios clínicos de novos agentes promissores que podem cessar o desenvolvimento da doença (MOTA et al., 2011; ALETAHA et al., 2010).

De fato, a importância que foi dada aos indivíduos precocemente portadores da doença foi o maior avanço do novo consenso. Com isso, foi possível atingir uma nova parcela de acometidos, algo que não ocorria no antigo consenso americano/europeu, datado de 1987. Visando assegurar a possibilidade de obter diagnóstico nos estágios iniciais da enfermidade, o trabalho se baseia em um sistema de pontuação através de um escore de soma direta, como demonstrado pela tabela 3.

As manifestações são divididas em quatro domínios: acometimento articular, sorologia, duração dos sintomas e provas de atividade inflamatória. Pontuação maior ou igual a 6 (seis) classifica o paciente como portador de AR (MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2010; ARNETT et al., 1988).

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível. O período inicial da doença, em especial seus 12 primeiros meses (AR inicial), é considerado uma janela de oportunidade terapêutica, ou seja, um momento em que a intervenção farmacológica rápida e efetiva pode mudar o curso da doença em longo prazo. A remissão completa, apesar de não ser o objetivo final do tratamento, raramente é alcançada (KLARENBECK et al., 2010; AZEVEDO, FERRAZ & CICONELLI, 2008).

Tabela 3. Novos critérios classificatórios para artrite reumatoide (adaptado de MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2010).

Critérios	Pontuação (escore)
População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema)	
Sinovite que não seja melhor explicada por outra doença	
Acometimento articular (0-5)	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
> Mais de 10 articulações (pelo menos uma pequena)	5
Sorologia (0-3)	
FR negativo e ACPA* negativo	0
FR positivo ou ACPA positivo em baixos títulos	2
FR positivo ou ACPA positivo em altos títulos	3
Duração dos sintomas (0-1)	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1
Provas de atividade inflamatória (0-1)	
PCR* e VHS* normal	0
PCR ou VHS normal	1

*ACPA = anticorpos antiproteínas e peptídeos citrulinados; PCR = dosagem da proteína C reativa; velocidade de hemossedimentação (VHS).

A aplicação de consensos é essencial para a avaliação da atividade da doença, para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico da mesma e para dar subsídio à avaliação da qualidade de vida e da incapacidade dos pacientes.

Deve-se iniciar o tratamento da AR com a educação do paciente sobre as condições da enfermidade e com o acompanhamento multidisciplinar de equipe especializada. O esclarecimento acerca da doença pode fazer com o que o indivíduo inicie de imediato a terapia não medicamentosa. Esta consiste em acompanhamento funcional, práticas de fisioterapia e terapia ocupacional. Aqui, o objetivo é a manutenção do aparelho locomotor e do sistema cardiorrespiratório, promovendo: proteção articular, condicionamento muscular e diminuição da dor. O papel do repouso e do exercício deve ser enfatizado, reconhecendo-se que a degeneração articular na AR é maior quando o repouso é prolongado (ALEHATA et al., 2010).

Sobre o tratamento medicamentoso, esse varia de acordo com o estágio da doença, sua atividade e gravidade. Para o controle da dor e do processo inflamatório articular, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), associado ou não a baixas doses de glicocorticoides (GC), é importante adjuvante à terapêutica de base. Os AINEs são úteis para diminuir o processo inflamatório e a dor, principalmente no início da doença, pois as drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) não têm ação imediata. A HCQ, por exemplo, quando usada para o tratamento crônico da AR, a dose – entre 155 mg e 310 mg – é geralmente administrada na forma oral, levando frequentemente de 4 a 6 meses para tornar-se aparente. Vale salientar que o uso prolongado de GC deve ser acompanhado de suplementação de cálcio e vitamina D. Quanto à escolha do AINE, não existem estudos significativos que demonstrem a diferença de eficácia entre eles. Logo, há necessidade de individualizar a escolha de acordo com os fatores de risco de cada paciente. (ALEHATA et al., 2011; ALBERS et al., 2001; MORELAND & O'DELL, 2002; CHEHATA et al., 2001; GOTZSCHE & JOHANSEN, 2004; TETT et al., 1989).

Com a clara definição do diagnóstico da doença, as DMCD devem ser indicadas. Como exemplo destas, têm-se os antimaláricos. No tratamento da AR, o sulfato de HCQ é geralmente utilizado em associação a outros dois medicamentos. A tripla-terapêutica envolve, além deste, metotrexato (MTX) e sulfalazina (SL). Tal regime é bastante aceitável por ser seguro, bem tolerado e barato, em comparação aos tratamentos mais caros, como o uso de DMCD biológicas (MORELAND, 2012; O'DELL et al., 2002).

A HCQ, como monoterapia, é indicada apenas quando em casos precoces da doença ou quando a doença tem baixo ou nenhum potencial erosivo de articulações. Conforme

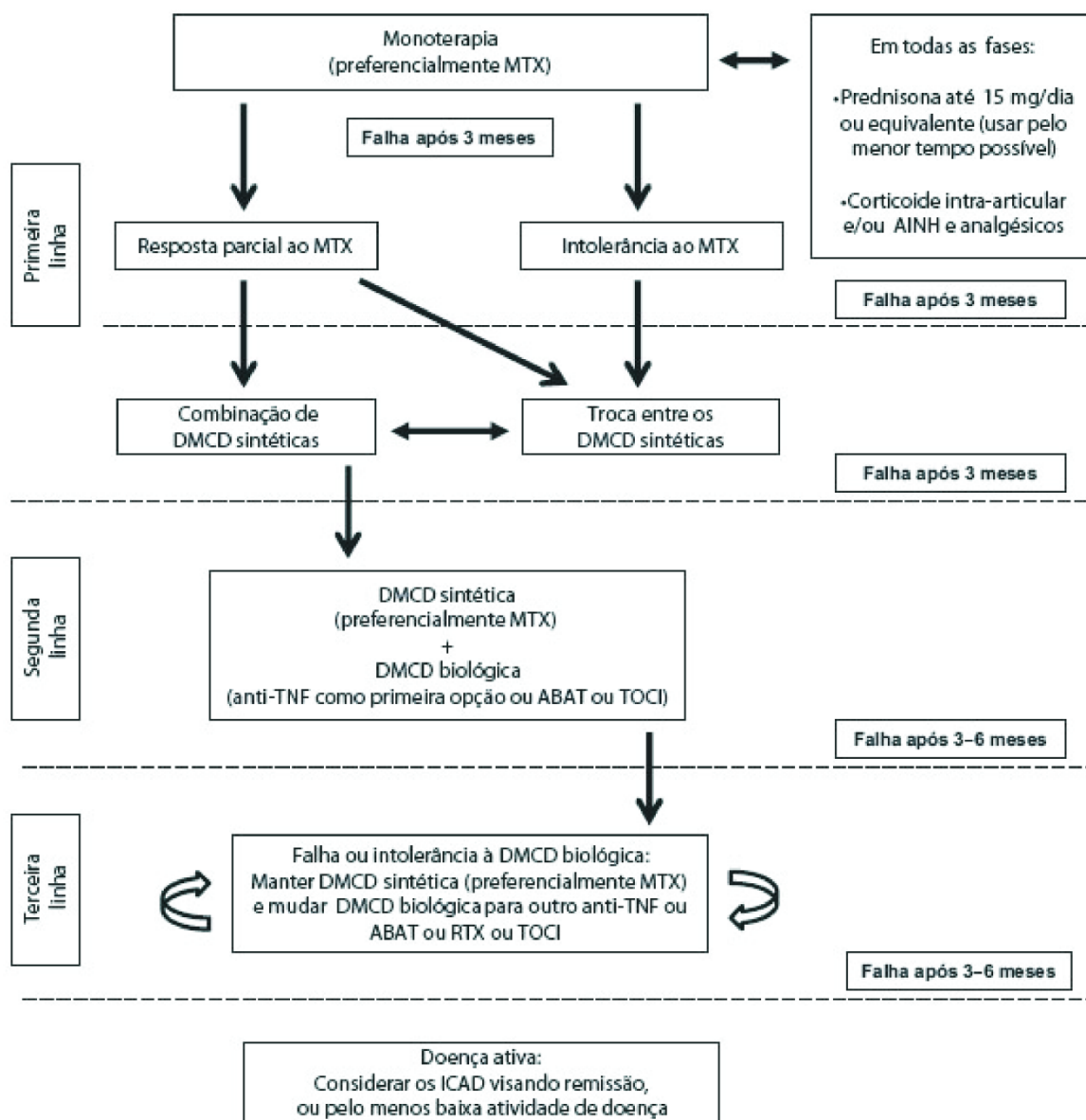
estudos, ela é capaz de reduzir os parâmetros clínicos e laboratoriais, embora, isoladamente, não altere a progressão radiográfica. A SL, pertencente ao grupo dos salicilatos e sulfamidas, é considerada mais efetiva – em relação à HCQ – na redução da atividade da doença, no controle da dor e na avaliação clínica global, além de interferir benéficamente na progressão radiográfica. Já o MTX, agente imunomodulador, demonstrou-se mais eficaz em reduzir sinais e sintomas de atividade da AR e melhorar o estado funcional, além de bloquear a progressão de lesões radiográficas. Este é, portanto, o fármaco de primeira escolha para o tratamento da AR. Alternativas terapêuticas mencionam o uso, menos comum, de leflunomida, azatioprina e ciclosporina (ALEHATA et al, 2011; BÉRTOLO et al., 2009; SHARP et al., 2000; SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000^a; SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000^b; SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000^c).

Os agentes antimaláricos possuem mecanismo de ação no tratamento da AR muito pouco esclarecido. Provavelmente, são capazes de desencadear ação multifatorial, envolvendo: atividade anti-inflamatória e interferência na produção de prostaglandinas. A essa primeira relaciona-se a estabilização das membranas lisossomais, inibição de enzimas lisossômicas e da quimiotaxia e fagocitose de polimorfonucleares. Estudos mostram ainda a ocorrência de atividade imunossupressora, atribuída à produção do fator reumatoide em reações agudas à doença. A HCQ, em especial, acumula-se nos glóbulos brancos, estabilizando a membrana lisossômica e inibindo a atividade de várias enzimas, incluindo a protease e a collagenase, responsáveis pela quebra da cartilagem (WOLFE, 2000; THE HERA STUDY GROUP, 1995; CLARK et al., 1993).

A Figura 3 ilustra a conduta terapêutica que deve ser adotada para o tratamento da AR, conforme menciona o consenso brasileiro.

Alternativas terapêuticas vêm sendo citadas na literatura recente. Entretanto, devido ao alto valor agregado, alguns podem ser inviáveis. Deve haver, portanto, acompanhamento específico para cada paciente, a depender também dos recursos do setor hospitalar. Os sais de ouro são exemplos desses tratamentos. Os aurotioglicose e aurotiomalato são capazes, tanto de reduzir os sintomas constitucionais e articulares, quanto de retardar a evolução radiográfica da AR e podem ser usados em monoterapia ou em combinação com outros agentes (LEHMAN et al., 2005; RAU et al., 2002).

Figura 3. Fluxograma do algoritmo para o tratamento da artrite reumatoide (MOTA et al., 2011).



Um dos mais relevantes avanços na terapia da AR foi o desenvolvimento das DMCD biológicas. Embora eficazes, possuem segurança em longo prazo ainda não claramente estabelecida. São indicadas para pacientes que persistem com atividade da doença, apesar do tratamento com pelo menos dois esquemas de DMCD sintéticas. O uso de agentes biológicos deve ser feito associado a uma DMCD, preferencialmente MTX (MOTA et al., 2011; ALEHATA et al., 2011).

Pode haver indicação de tratamento cirúrgico em pacientes portadores de AR. Isso é visto em situações nas quais as medidas clínicas e fisioterápicas não resultaram no controle dos sintomas e/ou da qualidade de vida do paciente. Sinovectomia e artroplastias de joelhos e

quadril são comuns e, indicadas precocemente, apresentam melhores resultados que aqueles quando as intervenções cirúrgicas são indicadas nas fases mais tardias (ALEHATA et al., 2011; BÉRTOLO et al., 2009).

3.1.2 Aspectos clínicos e terapêuticos do lúpus eritematoso sistêmico e lúpus eritematoso discoide

O LES é uma doença multissistêmica inflamatória do tecido conjuntivo. Caracteriza-se por desregulação do sistema imunológico com períodos de exacerbação e remissão, tendo o lúpus eritematoso cutâneo como principal manifestação clínica (SANTOS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2008).

Lesões de pele aparecem em torno de 70% dos pacientes com LES. Esse achado é o segundo mais frequente, sendo preterido apenas pelas manifestações articulares. O acometimento cutâneo é extremamente útil para o diagnóstico da enfermidade. Em certos casos, tal lesão oferece ajuda no prognóstico e na previsão de envolvimento de determinados órgãos internos (BECKHAUSER et al., 2008)

Crianças e adolescentes acometidos representam desafio especial para os médicos. A doença causa profundo impacto sobre a qualidade de vida e o desenvolvimento psicossocial desses pacientes. O reconhecimento das condições especiais relacionadas ao crescimento físico e emocional de cada indivíduo interfere diretamente na escolha da terapia. Essa complexa interação de fatores influencia, de maneira crucial, o sucesso do tratamento. O início na fase infanto-juvenil é frequentemente descrito como mais grave, sendo o prognóstico diretamente relacionado à idade de início da doença e a sobrevida relacionada ao comprometimento sistêmico dos rins e sistema nervoso central (APPENZELLER et al., 2005).

O tratamento do LES deve ser individualizado e dependente da gravidade do acometimento dos órgãos ou sistemas. Em relação à utilização da HCQ, este vem sendo utilizado há quase 50 anos. O interesse nesta molécula ainda persiste devido à relação risco/benefício, seu baixo custo e a disponibilidade de método de doseamento sanguíneo (COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2008).

A comprovação da efetividade do tratamento com HCQ é feita devido à melhora das manifestações cutâneas e articulares da doença, além de outras manifestações clínicas como: artrite, serosite, anormalidades hematológicas e nefrológicas. Não obstante, o risco de crise

reincidente de lúpus pode duplicar e/ou agravar quando na retirada desse fármaco (PONS-ESTEL, 2010; KASITANON et al, 2006; ARNAL, 2002; THE CANADIAN HYDROXYCHLOROQUINE STUDY GROUP, 1991; DUBOIS, 1978).

Nord e colaboradores (2004) demonstraram a importância de alertar ao paciente sobre o risco que existe de se desenvolver cardiotoxicidade em pacientes portadores de LES. Embora seja algo raro, casos isolados já foram relatados. Isso parece ocorrer dado devido à doença cardíaca primária e aterosclerose acelerada, situações características da enfermidade. Portanto, a biópsia endomiocárdica é sugerida quando na suspeita desse tipo de toxicidade.

Há crescente reconhecimento de que a doença cardiovascular é uma das causas de morbidade e mortalidade prematura na AR e LES, o que levou ao particular interesse no sulfato de HCQ, que tem um perfil cardiovascular benéfico. Essa ideia renovou o interesse acerca deste medicamento antigo, com estudos sugerindo que todos os pacientes com LES, incluindo crianças, devem ser tratados com sulfato de HCQ, independentemente de manifestações clínicas da doença (GASPARYAN et al., 2012; COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2010; RUIZ-IRASTORZA et al., 2008; PETRI et al., 1996).

Apesar de ser utilizado como tratamento secundário – em grandes estudos, apenas 50% dos pacientes recebem sulfato de HCQ –, estudos sugerem um retardo do dano renal, além de reduzir a possibilidade do desenvolvimento de doença renal crônica em pacientes em estado terminal (PONS-ESTEL et al., 2009; SISÓ et al., 2008).

Além disso, o uso de sulfato de HCQ em pacientes com LES é associada com a sobrevivência global melhorada, redução da acumulação de danos e menores taxas de infecção. Outros dados sugerem que o início da enfermidade pode ser atrasado se a administração do fármaco for iniciada em fases pré-clínicas (ALARCÓN, 2007; FESSLER, 2005; MOLAD, 2002; RUIZ-IRASTORZA, 2009; JAMES, 2007).

Outro fator interessante é que o sulfato de HCQ é barato, especialmente em comparação com os tratamentos para LES mais recentes, e está amplamente disponível, mesmo em países em desenvolvimento. Na prática clínica, a não remissão do LES é a principal razão para considerar a retirada do sulfato de HCQ. Tendo em vista a frequência de crises subsequentes após término do tratamento, acredita-se que a continuação da tomada do fármaco deve ser seriamente considerada como alternativa para a retirada de todos os tratamentos alternativos para LES. Por outro lado, a interrupção definitiva do sulfato de HCQ deve ser feita quando o LES permanecer ativo durante longo período de tempo (COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2009).

O LED (ou lúpus eritematoso cutâneo crônico) é uma dermatose crônica autoimune, a variante clínica mais comum do lúpus eritematoso (LE). É desencadeado ou agravado pela exposição à radiação ultravioleta, frio e determinados fármacos (FARIAS et al., 2011)

As manifestações clínicas do LED são múltiplas e variadas. A apresentação acneiforme é rara, com apenas 6 casos descritos na literatura científica até agora. Essa forma costuma ser subdiagnosticada em virtude da semelhança com doença inflamatória acneica comum. Portanto, o diagnóstico diferencial é de extrema importância, obtendo a confirmação do acometimento do LED através de exames histológicos (FARIAS et al., 2011).

O tratamento é frequentemente associado às manifestações cutâneas, logo, a conduta terapêutica tópica é essencial. Os responsáveis, médicos e legais, devem advertir o uso de protetores solares como prevenção à progressão da doença. Já para o acometimento sistêmico, observa-se a utilização de tetraciclina e hidroxicloroquina. Farias e colaboradores (2011) demonstraram melhora clínica significativa após 6 meses de tratamento em pacientes que recebiam 400 mg de HCQ ao dia. A continuidade do trabalho ainda evidenciou a ausência de sinais e sintomas de comprometimento sistêmico, resultado obtido após 12 meses de terapia (FARIAS et al., 2011).

3.1.3 Aspectos clínicos e terapêuticos da síndrome de Sjögren

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune sistêmica. Caracteriza-se por lesão progressiva das glândulas exócrinas, acompanhada por diversas manifestações extra glandulares. Mais comumente, acomete superfícies mucosas (boca e olhos secos). O desenvolvimento de linfoma também é complicação reconhecida (PERI et al., 2012; SHIBOSKI et al., 2012; SJÖGREN, 1933).

É uma das doenças autoimunes mais comuns nos EUA, com estimativas de 0,5 a 3 milhões de pessoas afetadas, principalmente em mulheres no período perimenopausal. E, embora seja doença crônica, os sintomas de ressecamento das mucosas podem acometer um indivíduo previamente saudável. A este, dá-se a classificação de portador de síndrome de Sjögren primária (SJÖGREN, 1933).

A SS pode ser vista como doença primária ou em associação com outras doenças autoimunes, tais como: AR, LES e esclerose sistêmica; onde passa a ser definida como Síndrome de Sjögren secundária. Tais doenças afetam significativamente na qualidade de vida dos pacientes (SHIBOSKI et al., 2012; VITALI et al., 2002).

O diagnóstico da SS é tarefa bastante complexa. Vários critérios de prognóstico e diagnóstico não haviam sido validados até 1986, quando, em Copenhagen, foi publicado: *The First International Symposium on Sjögren's Syndrome*. Em 2002, após discussão e avaliação desses critérios entre especialistas americanos e europeus, uma versão revisada foi apresentada à comunidade internacional de reumatologistas. O Consenso Americano-Europeu introduzia a necessidade de efetuar diagnóstico diferencial, distinguindo a enfermidade daquelas com manifestações clínicas e/ou achados laboratoriais semelhantes (VITALI et al., 2002).

A mais recente revisão, datada de 2012, trouxe novos critérios de classificação para a SS. Dentre as inovações e pontos considerados importantes, o *American College of Rheumatology Classification Criteria for Sjögren's Syndrome: A Data-Driven, Expert Consensus Approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort*, destaca: a necessidade de incrementar o suporte à pesquisa genética e etiológica e ensaios terapêuticos para a enfermidade; a clareza, facilidade e alta especificidade da inserção dos pacientes em ensaios clínicos, considerando os efeitos adversos potencialmente graves e morbidades dos agentes biológicos; e a nova base de dados utilizada para a construção do consenso a partir de registro de instrumentos padronizados e testes diagnósticos (SHIBOSKI et al., 2012).

Até o momento, não há nenhum tratamento capaz de modificar a evolução da SS. A terapêutica é baseada na substituição sintomática (lágrimas e saliva artificiais) ou estimulação da secreção glandular, usando medicação tópica ou oral. As implicações extra glandulares e sistêmicas devem ser tratadas com glicocorticoides e agentes imunossupressores, respectivamente. Estudos demonstram a eficácia da terapia com agentes biológicos, como o rituximabe, para o tratamento de portadores da SS primária (RAMOS-CASALS, TZIOUFAS & FONT, 2007; RAMOS-CASALS & FONT, 2005; TZIOUFAS & MOUTSOPOULOS, 2003).

A terapia sistêmica para SS consiste em vários medicamentos bem conhecidos, tais como: os corticosteroides, azatioprina, metotrexato, fármacos de origem biológica (imunoglobulinas). A terapêutica com o sulfato de HCQ também é associada ao tratamento da doença. Apesar de agir como imunossupressor, o fármaco não possui mecanismo de ação totalmente esclarecido (RAMOS-CASALS et al., 2010; KRUIZE et al., 1993).

Tendo em vista que a SS é doença autoimune, a utilização de fármacos capazes de reduzir os níveis séricos de anticorpos é considerado terapeuticamente efetivo, principalmente as imunoglobulinas IgM e IgG, que respondem à infecções agudas e crônicas,

respectivamente. Nesse caso, propõe-se que a HCQ tenha influência direta sobre os linfócitos T, atuantes na cascata metabólica que leva a síntese dessas imunoglobulinas. Sugere-se também que o fármaco aja na função fagocitária dos antígenos pelos macrófagos, uma vez que, se a função dos macrófagos está comprometida, a depleção das células saudáveis do organismo, por sua vez, reduzirá, melhorando o quadro clínico do paciente. O estudo ainda postula que o uso da HCQ diminui a velocidade de sedimentação dos eritrócitos e os níveis séricos de gamaglobulinas. Tendo em vista que os níveis de sedimentação dos eritrócitos estão diretamente ligados a várias doenças, inclusive as de origem reumática, a redução da velocidade de sedimentação indicaria baixa na infecção causada pela doença (RAMOS-CASALS et al., 2010; KRUIZE et al., 1993).

Não há evidências clínicas significativas de eficácia e efetividade do tratamento utilizando o sulfato de HCQ, havendo apenas alguns curtos estudos. Lakhanpal e colaboradores (1985) relataram melhora subjetiva nas condições de secura dos olhos e boca, em três pacientes com duração de 9, 20 e 59 meses, respectivamente. (RAMOS-CASALS et al., 2010). Corroborando com esses resultados, Fox e colaboradores (1988) ainda demonstraram melhores resultados de exames laboratoriais, em um pequeno estudo aberto, utilizando 20 pacientes. Entre outros benefícios, a diminuição da IgG total foi bastante significativa. Apesar de confirmar esses achados laboratoriais, Kruize e colaboradores (1993) concluíram, em um estudo randomizado duplo cego cruzado, que o uso do sulfato de HCQ em uma dose de 400 mg por dia, tomada ao longo de 12 meses não tem um efeito clínico benéfico em pacientes com síndrome de Sjögren.

O uso do sulfato de HCQ é geralmente associado em politerapia e deve ser prescrito em casos mais graves e de difícil controle, levando em consideração o risco potencial de desenvolvimento de lesão da retina.

3.1.4 Aspectos clínicos de achados terapêuticos

Relatos apontam a eficácia da HCQ em doenças diferentes daquelas que apresentam condições reumáticas. Embora alguns desses estudos estejam baseados em estudos de caso individuais, há uma gama de ensaios clínicos randomizados e controlados por placebo que comprovam a afirmativa. Alguns desses relatos estão descritos a seguir (OLSEN, 2013).

A primeira informação diz respeito à *diabetes mellitus*. Condições hipoglicemiantes em pacientes tratados com HCQ e CQ vêm sendo observadas há décadas. Três pequenos

ensaios clínicos, randomizados e controlados, utilizando pacientes desprovidos de outras complicações reumáticas e recebendo uma dose relativamente alta de sulfato de HCQ (600 mg), reforçaram tal situação (QUATRARO et al., 1990).

O impasse talvez seja o real diagnóstico dessa reação ao tratamento, distinguindo-a dos efeitos gerais de uma infecção sistêmica, uma vez que tais pacientes, muitas vezes, estão recebendo terapia antimalárica. A magnitude dessa condição pode ser suficiente para anular a necessidade de insulina ou causar coma por hipoglicemia (KANG, MIKULS & O'DELL, 2009; SHOJANIA KOEHLER & ELIOTT, 1999; WHITE et al., 1987).

Um breve estudo prospectivo com obesos, não diabéticos e não portadores de doenças autoimunes demonstrou a melhoria da sensibilidade à insulina, em tratamento usando HCQ durante 6 semanas. Esses resultados sugerem que há uma redução não só da incidência de diabetes tipo 2 em pacientes que estão sendo tratados com sulfato de HCQ para outras condições, como também da taxa de glicemia sanguínea e da resistência à insulina. É provável que esse efeito da HCQ sobre a glicose esteja relacionada a alterações do pH intra-endossomal, ação essa que resulta na redução da degradação da insulina no tecido adiposo humano (OLSEN et al., 2013; MERCER et al., 2012).

Outro achado interessante é a capacidade da HCQ de reduzir eventos tromboembólicos. Há mais de duas décadas, Johnson & Charnley (1979) relataram a utilidade profilática do sulfato de HCQ para evitar significativos eventos trombóticos em condições pós-operatórias de artroplastia total do quadril. Uma análise de coorte prospectiva demonstrou efeito protetor dos antimaláricos no desenvolvimento de trombose, bem como em melhoria significativa da sobrevivência. Um estudo mais recente – análise de coorte-base, utilizando 1930 pacientes portadores de LES – analisou os fatores que foram associados a um ou mais eventos trombóticos, no qual se evidenciou que o uso de sulfato de HCQ foi significativamente associado a um risco reduzido de trombose, principalmente em pacientes jovens (RUIZ-IRASTORZA et al., 2010; KAISER, CLEVELAND & CRISWELL, 2009; WALLACE, 1987; ERNST, ROSE & LEE, 1984; JOHANSSON, FORSBERG & JOHANSSON, 1981).

Vários mecanismos têm sido propostos para os efeitos antitrombóticos do sulfato de HCQ. O mais provável parece ser a redução de agregação plaquetária ou ainda, a inibição da liberação dos alfa-grânulos, estruturas que possuem os fatores que participam da cascata de coagulação. Porém, esses achados limitam-se a estudos *in vitro*. No entanto, a concentração necessária para que seja possível observar tal efeito (25 mg/mL) é 200 vezes maior do que os níveis no sangue que são relatados em pacientes tratados, de modo que pode ser explicada a

razão deste efeito permanecer apenas especulativo (FRANCÈS et al., 2012; PROWSE, PEPPER & DAWES, 1982; JOHANSSON, FORSBERG & JOHANSSON 1981).

A redução do risco cardiovascular, devido ao efeito geral benéfico sobre o perfil lipídico quando em tratamento com o sulfato de HCQ, já é reconhecido há duas décadas. Petri e colaboradores (1994), em estudo de coorte longitudinal, mostraram associação significativa entre o tratamento com sulfato de HCQ, com doses entre 200 a 400 mg por dia, e menores níveis de colesterol. Resultados semelhantes foram obtidos por Rahman e colaboradores (1999), destacando ainda a recuperação dos níveis de colesterol quando na descontinuação da terapia com o sulfato de HCQ. Assim, estudos recentes vêm comprovando a redução de níveis lipídicos, colesterol total e até mesmo de lipoproteínas de baixa densidade em pacientes portadores de AR ou LES, os quais recebem tratamento com o fármaco em questão, por períodos de tempo relativamente diminutos (CAIROLI et al., 2012; MORRIS et al., 2011; MIRJAFARI, AL-HUSAIN & BRUCE, 2011; O'DELL et al., 2001; KAVANAUGH et al., 1997; MUNRO et al., 1997).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações do perfil lipídico com sulfato de HCQ não estão bem elucidadas. Estudos postulam que isso ocorre devido à taxa de depuração significativamente mais elevada de frações lipídicas ou até mesmo à regulação positiva do receptor de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL) (SACHET et al., 2007).

Pelo fato de ter sido desenvolvido como agente antiparasitário, uma possível eficácia em relação a outros tipos de infecção pode ser prevista. Assim, é correto associar o tratamento de pacientes com doenças autoimunes, utilizando sulfato de HCQ, ao menor risco de infecções. Isso foi evidenciado em uma análise de mais de 200 pacientes, portadores de nefrite lúpica, onde o grupo de pacientes em que os antimaláricos foram utilizados antes do diagnóstico de nefrite apresentou quadros infecciosos significativamente menores do que aqueles que não receberam tratamento com um dos fármacos dessa classe terapêutica. Além disso, dos 20 pacientes que vieram a óbito, 19 estavam no grupo que não recebeu o sulfato de HCQ e, seis destes nove, morreram como resultado de infecções, enquanto que nenhuma morte por causas infecciosas foi observada no grupo tratado com sulfato de HCQ (OLSEN et al., 2013; SISÓ et al., 2008).

Talvez o fator mais surpreendente seja a grande quantidade de literatura publicada documentando a utilidade de antimaláricos, sulfato de HCQ em especial, no tratamento de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Há pouco mais de uma década, dois ensaios clínicos controlados demonstraram a eficácia do sulfato de HCQ na infecção pelo micro-organismo.

O primeiro destes, um estudo controlado com placebo, no qual 40 pacientes com níveis de linfócitos T CD4+ maiores do que 200 células/mm³, foram randomizados para receberem 800 mg/dia de sulfato de HCQ ou placebo, durante 8 semanas. O grupo tratado mostrou um declínio significativo nos níveis de ácido ribonucleico (RNA) viral, enquanto que este valor foi maior no grupo de tratamento com placebo. A percentagem de células T CD4+ permaneceu estável (SPERBER et al., 1995).

O segundo estudo trazia 72 pacientes, soropositivos para o HIV, os quais foram randomizados para receber a mesma dosagem do fármaco, mas dessa vez, ao invés do placebo, estes receberiam 500 mg/dia de zidovudina (ZDV), em um esquema duplo-cego. O grupo tratado com o antimalárico mostrou uma diminuição significativa do RNA viral plasmáticos, após 16 semanas de tratamento, mantendo estável o nível de células T CD4+, além de baixos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e de imunoglobulina G (IgG) após o tratamento. O grupo tratado com ZDV também obteve um número significativamente menor de cargas virais, entretanto, não houve alterações de grande magnitude nos níveis séricos de IL-6 ou de IgG. Uma vez que níveis elevados de IL-6 são geralmente associados a um maior risco de progressão do HIV, estes resultados com sulfato de HCQ foram encorajadores em termos de modulações imunológicas, uma vez que estas são geralmente favoráveis e podem contribuir para a eficácia global da terapia em, pelo menos, alguns pacientes infectados (OLSEN, 2013; SPERBER et al., 1997).

Paton & Aboulhab (2005), utilizando uma dose menor de sulfato de HCQ (200 mg/dia), hidroxiureia e didanosina – inibidor da transcriptase reversa –, atestaram a significativa redução da carga viral em cerca da metade dos pacientes, com níveis indetectáveis no final do estudo, permanecendo constante o nível de linfócitos T CD4+.

A princípio, a ideia de se confeccionar formas farmacêuticas contendo um fármaco relativamente barato para a terapia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi considerada plausível, visando utilizá-las em países menos ricos com altas taxas de infecção pelo HIV. Em contrapartida, a disponibilidade de medicamentos genéricos de baixo custo e o apoio do governo nesse tipo de tratamento reduziu a urgência e interesse sobre a abordagem. No entanto, o uso da HCQ adjuvante em associação de dose fixa com determinados fármacos para o tratamento da AIDS vem sendo bastante discutido (AGUIRRE-CRUZ et al., 2010; SAVARINO et al., 2001).

O mecanismo dessa ação antimicrobiana parece ser a alcalinização de vesículas ácidas intracelulares, o que inibiria o crescimento dos micro-organismos. Estudos também sugerem que a redução na carga viral na infecção pelo HIV ocorre devido à perturbação da glicosilação

pós-transducional do envelope protéico do vírus (proteína gp120), resultando na redução da capacidade infecciosa de partículas virais recém-produzidas (ROLAIN, COLSON & RAOULT, 2007; SAVARINO et al., 2001; CHIANG et al., 1996).

O efeito protetor do tratamento utilizando o sulfato de HCQ sobre o risco de tumores malignos no LES tem sido sugerido por determinados estudos observacionais. A razão para que haja certa discrepância de resultados entre esses estudos parece ser o longo prazo de seguimento – duas ou mais décadas – para que seja possível a observação de possíveis efeitos sobre o desenvolvimento de doenças malignas (SISÓ et al., 2008; RUIZ-IRASTORZA et al., 2007).

A incorporação deste antimalárico em regimes de quimioterapia tornou-se inovadora na área da oncologia. A abordagem baseia-se na hipótese de que as ações lisossomais, característica do mecanismo de ação do sulfato de HCQ, possam aumentar a resposta padrão dos agentes quimioterápicos. Entretanto, limitados estudos clínicos sugerem que esta pode ser uma abordagem útil (OLSEN et al., 2013; MANSILLA et al., 2010).

3.1.5 Efeitos adversos do uso da hidroxicloroquina

Os riscos do tratamento com sulfato de HCQ são relativamente baixos. Em geral, correspondem à intolerância gastrointestinal (náuseas, vômitos, dor abdominal), hiperpigmentação da pele, branqueamento dos cabelos, cefaleia, tontura. No entanto, continua a existir um potencial específico para efeitos adversos mais graves, como a lesão de retina (retinopatia) e neuromiotoxicidade (OLSEN et al., 2013; MARMOR et al., 2011; WOLFE et al., 2010; TANENBAUM, DENNY & TUFANELLI, 1990).

A identificação de indivíduos que correm alto grau de risco para o desenvolvimento desses problemas seria útil, mas poucas análises preditivas são confiáveis. Durante muitos anos, o peso corporal tem sido defendido como um marcador, mas um estudo recente sugere que esta variável, bem como a idade e dosagem diária, não estavam relacionadas com a toxicidade. A segurança pode ser reduzida em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6FD), logo, o uso de antimaláricos deve ser evitado. Essa classe terapêutica funciona como compostos indutores de hemólise em indivíduos com deficiência da enzima G6FD, importante antioxidante dos glóbulos vermelhos (OLSEN et al., 2013; MARMOR et al., 2011; WOLFE et al., 2010).

Muitos desses efeitos adversos parecem ocorrer devido ao acréscimo do pH endossomal, o que altera o processamento de certas proteínas e a ligação de componentes biológicos aos receptores. Outros estudos postulam diferentes mecanismos, como: fortes ligações *in vitro* fármaco:ácidos nucleicos e inibição do cálcio de sinalização em células linfoides (KUZNIK et al., 2011; GOLDMAN et al., 2000).

Os efeitos adversos oculares e cutâneos da HCQ são possivelmente reações fototóxicas. Dos relatos de substâncias medicamentosas que causam fototoxicidade, um número significativo deles contém cloro, como a HCQ. Sugere-se que o radical livre cloreto, formado da quebra da ligação C-Cl, seja um dos responsáveis pelos danos, uma vez que esse se combina com proteínas da pele, por exemplo (MOORE & HEMMENS, 1982; MOORE & TAMAT, 1980, TØNNESEN et al., 1988).

Por razões como estas, o uso de antimaláricos exige um acompanhamento regular e supervisão médica.

A toxicidade ocular associada aos agentes antimaláricos foi observada pela primeira vez em 1957. Em 1959, Hobbs & Sorsby reconheceram pela primeira vez a toxicidade retiniana associada ao uso de hidroxicloroquina (WEINBERG & D'AMICO, 1994; HOBBS & SORSBY, 1959).

Estudos iniciais relataram casos de retinopatia quando no uso de antimaláricos para o tratamento de doenças como AR e LES. Toxicidade retiniana mediada pelo uso crônico de sulfato de HCQ tem uma baixa incidência, menor que aquela apresentada pela CQ, além de ser menos grave também. Isso ocorre devido à presença do grupo hidroxil, sendo o fármaco incapaz de ultrapassar a barreira hematorretidiana, diferente da CQ, o que poderia causar a opacidade da córnea ou alterações de motilidade (MAVRIKAKIS et al., 2003; MAVRIKAKIS et al., 1996).

Trabalhos mostram que a frequência da retinopatia causada pelo acúmulo de HCQ varia de 0,001 a 40%, mas milhares de pessoas utilizam este medicamento para diversos fins. Contudo, a toxicidade oftalmológica deste fármaco é uma preocupação séria, pois, mesmo após a retirada da medicação, há pouca ou nenhuma recuperação visual, e, por vezes, há progressão da perda visual (EASTERBROK, 1993; RAINES, BHARGAVA & ROSEN, 1989; ELMAN et al., 1976; HOBBS, EADIE & SOMERVILLE, 1961; HENKIND & ROTHFIELD, 1963).

Em 2002, a Academia Americana de Oftalmologia publicou recomendações para o diagnóstico e/ou prognóstico da retinopatia induzida por CQ ou HCQ. Fato é que melhores ferramentas de rastreamento e novos conhecimentos sobre a prevalência de toxicidade têm

aparecido nos anos seguintes à publicação, justificando a necessidade de atualização. Até o momento, não existe nenhum tratamento definitivo para esta complicação, por isso é necessário que médicos e pacientes estejam cientes do risco do uso do medicamento para minimizar possíveis danos tóxicos (MICHAEL et al., 2011; MARMOR et al., 2002).

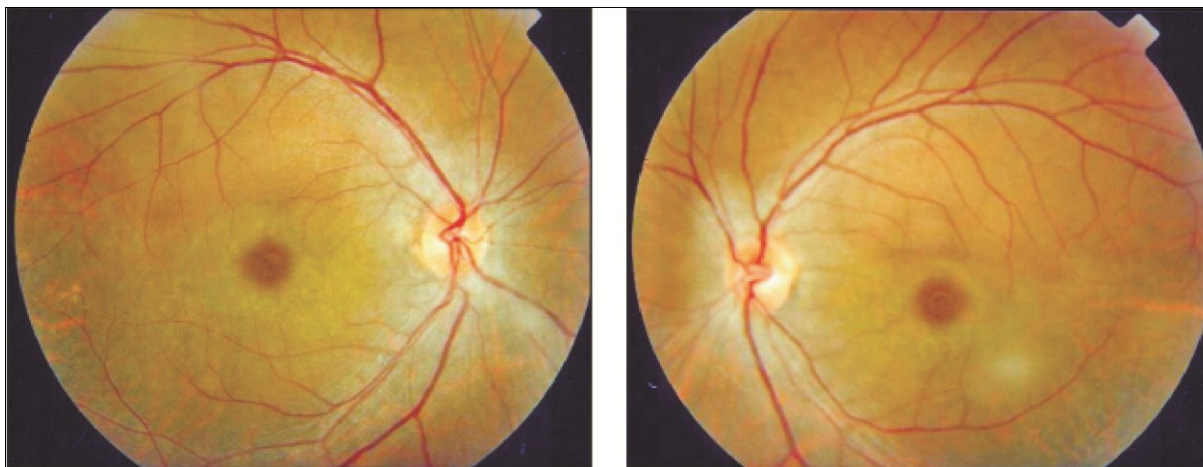
O mecanismo que causa toxicidade ocular não é bem compreendido. Agentes antimaláricos têm efeitos agudos sobre o metabolismo das células da retina, incluindo fotorreceptores. Entretanto, não é claro se estes efeitos metabólicos são as causas, em curto prazo, dos danos lento e crônico, que caracterizam o estado clínico de toxicidade. A HCQ se liga à melanina no epitélio pigmentado da retina e esta ligação acaba por concentrá-lo e contribuir ou prolongar os seus efeitos tóxicos (MICHAEL et al., 2011).

O quadro clínico da toxicidade mediada pelo acúmulo de sulfato de HCQ caracteriza-se classicamente por maculopatia em olho de boi (Figura 4). Essa condição resulta em defeitos reprodutíveis e bilaterais do campo visual, que pode ser detectada pela tela de *Amsler* ou perimetria automatizada. Pode haver uma fase muito precoce de perda funcional da visão, onde a retirada do fármaco permite uma reversão da toxicidade (MICHAEL et al., 2011; SILVA & SILVA, 2009).

Novos dados demonstraram que o risco de toxicidade aumenta abruptamente para 1% depois de 5 a 7 anos de uso, ou uma dose cumulativa de 1000 g de sulfato de HCQ, tendo em vista que a dose individual é de, geralmente, 400 mg ou calculada por peso-dependência. O risco aumenta ainda mais com o uso continuado da droga. A falha renal ou hepática deve ser considerada, uma vez que esses órgãos são os responsáveis pela depuração do fármaco. A idade, fatores genéticos e pacientes portadores de maculopatia devem também ser considerados como fatores de risco determinantes para a descontinuação do tratamento. É desaconselhado o tratamento prolongado em crianças e em portadores de hipersensibilidade às 4-aminoquinolonas (MICHAEL et al., 2011).

Aos pacientes que irão se submeter ao uso de antimaláricos, um exame inicial é aconselhado para servir como um ponto de referência e para descartar maculopatia. Este é um agravamento da retinopatia de caráter genético, o que pode vir a ser uma contraindicação ao uso desses agentes terapêuticos. O protocolo de rastreio anual deve ser iniciado após 5 (cinco) anos de exposição continuada ao fármaco. Testes como eletrorretinograma multifocal, tomografia de coerência óptica, fundo autofluorescência, além de exames habituais como campos de visão e exames de fundo de olho são altamente preconizados. (MICHAEL et al., 2011).

Figura 4. Retinografia a cores: Mácula em olho de boi (SILVA & SILVA, 2009).



Aconselha-se que os pacientes devam estar cientes do risco de toxicidade e dos fundamentos para a triagem, visando à detecção ou minimização da incidência do efeito. Os medicamentos devem ser interrompidos, se possível, quando a toxicidade é reconhecida ou fortemente suspeita. Esta é uma decisão a ser tomada em conjunto: pacientes e seus médicos (MICHAEL et al., 2011).

3.1.6 Aspectos Farmacocinéticos

O sulfato de HCQ é comercializado e administrado ao paciente como racemato, mistura equimolar de dois enantiômeros: (+)-HCQ e (-)-HCQ. Entretanto, não há informação disponível sobre possibilidades de disposição estereosseletiva e atividades farmacológicas dos enantiômeros isolados (SOLOMONS & FRYHLE, 2005; McLACHLAN et al, 1993).

Apesar deste fato, diversos estudos buscam mensurar a concentração de cada um dos enantiômeros da HCQ e de seus respectivos metabólitos. McLachman e colaboradores (1993) sugeriram a existência da atuação de um ou mais processo(s) estereosseletivo(s) no arranjo da molécula da HCQ em plasma e urina. Tais processos seriam: inversão quiral, absorção, distribuição e excreção renal. Entretanto, considerando a estabilidade dos grupos vicinais do centro quiral da molécula, a possibilidade de haver inversão quiral parece ser remota. Os demais se demonstraram estereosseletivos (BROCKS & MEHVAR, 2003; BROCKS et al., 1992; McLACHLAN et al., 1993; McLACHLAN et al. 1994; DUCHARME et al., 1994).

As altas concentrações de (-)-R-HCQ no sangue e plasma, comparadas àquelas vistas com o (+)-S-HCQ, corroboram a existência de processo(s) estereosseletivo(s) na disposição do

fármaco em questão. Postula-se que o enantiômeros (R) é preferencialmente concentrado pelos compostos celulares do sangue e, uma vez fixado, deixaria o enantiômero (S) mais disponível para o metabolismo. Entretanto, estudos mostram que este e os demais processos estereosseletivos apresentam significativa variabilidade entre diferentes indivíduos. (McLACHLAN et al., 1994; McLACHLAN et al., 1993; GUSTAFSSON et al., 1986).

Não há informações disponíveis capazes de garantir a eficácia e toxicologia de cada um dos enantiômeros. Também não se sabe qual deles é o responsável pela atividade antiartrítica. Haberkorn e colaboradores (1979) indicaram limitados dados de toxicidade em ratos, demonstrando que o (+)-R-CQ é o isômero mais tóxico por possuir menor dose letal que o seu enantiômeros (S). O trabalho ainda evidencia que a (+)-S-CQ, que tem a estrutura muito similar a HCQ, demonstrou atividade antimalárica mais potente que a (-)-R-CQ, em ratos. Entretanto, a simples semelhança estrutural não permite a extrapolação dos dados supracitados para o tratamento da artrite reumatoide (BROCKS et al., 1992).

O sulfato de HCQ apresenta absorção oral e intestinal variáveis com biodisponibilidade de aproximadamente 74% e distribui-se pelo organismo apresentando retenção prolongada nos olhos, fígado, epiderme, pulmões, outras áreas ricas em melanina. Na epiderme, a concentração do fármaco pode chegar a ser 100 a 200 vezes maior que os níveis plasmáticos. Nos eritrócitos, a concentração é de 2 a 5 vezes maior do que a plasmática, uma vez que a HCQ possui substancial capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (DUCHARME et al., 1994; TANENBAUM, DENNY & TUFFANELLI, 1980).

O metabolismo dos derivados da 4-aminoquinolona é complexo e extenso. Depois de longa administração, o plasma contém níveis significativos de HCQ e de seus três principais metabólitos, os quais ainda possuem o centro quiral. Portanto, todos existem em pares de enantiômeros, oito diferentes substâncias (IREDALE, FIEGER & WAINE, 1993).

Deve-se esperar o acúmulo do fármaco e seus metabólitos, quando em dosagens crônicas. O composto possui longa meia-vida plasmática, estimada em mais de 40 dias, logo pode atingir altas concentrações (6.000 a 80.000 vezes maior que o nível plasmático). Além disso, a meia-vida plasmática aumenta proporcionalmente ao aumento da dose. Estudos atuais são capazes de mensurar esse parâmetro farmacocinético por CLAE em sangue total (COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2006; TETT et al., 1989; TANENBAUM, DENNY & TUFFANELLI et al., 1980).

A principal via de excreção é a renal, com 23 a 25% do composto excretado em sua forma inalterada, juntamente com os metabólitos. Ducharme e colaboradores (1995) observaram eliminação mais rápida do enantiômero (+)-(S)-HCQ comparada com o (-)-(R)-

HCQ, provavelmente devido a mais rápida excreção urinária e metabolismo hepático. Esse resultado foi corroborado por Fieger e colaboradores (1993). O trabalho ainda evidenciou que os metabólitos derivados do enantiômeros (S) representaram 80-90% da dose urinária recuperada e que não foram detectados metabólitos no sangue.

Ao contrário do exposto por Tett e colaboradores (1989), overdoses por hidroxicloroquina, apesar de raramente relatadas, 7 (sete) casos foram evidenciados em uma revisão da literatura médica realizada por Marquardt e colaboradores (2001). Entretanto, ainda não há harmonização do tratamento dessa situação.

3.1.7 Aspectos Tecnológicos

Toda e qualquer matéria-prima adquirida possui uma gama de fatores intrínsecos, determinantes do delineamento de formas farmacêuticas. A indústria farmacêutica deve, portanto, realizar completo estudo sobre cada insumo utilizado. A essa investigação, dá-se o nome de caracterização. A caracterização, etapa fundamental do estudo de pré-formulação, tem como base a pesquisa da identidade do fármaco e de suas propriedades físico-químicas. Para tal, é possível recorrer a uma série de técnicas analíticas. Essas são frequentemente especificadas nas monografias publicadas em compêndios oficiais. Entretanto, muitas outras técnicas complementares podem ser feitas a fim de gerar completo dossiê contendo informações robustas sobre o fármaco em questão.

Inicialmente, deve-se garantir a identidade química de determinada matéria-prima. Nesse caso, métodos espectrofotométricos são bastante utilizados. Os espectrofotômetros de infravermelho (IV) e Raman oferecem procedimento simples e rápido capaz de identificar pequenas diferenças estruturais entre as moléculas. A seleção do método depende do princípio da técnica. A absorção no IV depende da variação do momento de dipolo da molécula e o espalhamento Raman, da variação da polarizabilidade. Isso resulta em informações complementares nos espectros Raman e IV, embora nos casos de baixa simetria molecular existam bandas nas mesmas posições, variando somente a intensidade. Geralmente, vibrações simétricas e grupos não polares fornecem as bandas de espalhamento de Raman mais intensas, enquanto vibrações assimétricas e grupos polares fornecem bandas de absorção mais intensas no IV (SPONG et al., 2004; STEPHENSON et al., 2001).

A espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV) é uma técnica utilizada para identificar moléculas dotadas de grupos cromóforos em sua estrutura. É confiável, rápida, de

fácil utilização, possui baixo custo operacional e é bastante simples no que diz respeito à interpretação de seus resultados (GALO & COLOMBO, 2009; SOARES et al., 2008).

A espectrometria de massa também pode ser utilizada para garantir a identidade estrutural. Na técnica, moléculas são bombardeadas com laser de elétrons de alta energia, convertendo algumas delas em íons, que são acelerados em um campo elétrico. Em seguida, os íons são separados de acordo com a relação massa-carga no campo elétrico e os íons que têm particular relação massa-carga são detectados por um dispositivo capaz de contar o número de íons que o atingem. Devido ao princípio do método, a técnica ainda possibilita a elucidação da estrutura química de produtos de degradação e, por consequência, de possíveis rotas degradativas (PAVIA, 2001).

A solubilidade da matéria-prima em dado solvente, à temperatura constante, é outro parâmetro característico da substância. Portanto, pode ser utilizada para identificação e avaliação de grau de pureza. Este princípio baseia-se na análise de solubilidade por fases e o procedimento consiste na adição de porções crescentes de amostra a volumes constantes de solvente no qual a substância analisada mostra apenas ligeira solubilidade, visando à obtenção de solução saturada dessa substância. Após o equilíbrio do sistema, sob agitação prolongada e temperatura constante, determina-se o conteúdo total de soluto na solução sobrenadante e traça-se o diagrama de solubilidade por fases. Os parâmetros de solubilidade são aplicados em todos os aspectos do delineamento de formas farmacêuticas. É possível dividir essa influência exercida em três principais grupos: a previsão das propriedades de materiais desconhecidos, avaliação dos efeitos sobre as propriedades de processamento de materiais e a previsão de interações e incompatibilidades entre materiais (BRASIL, 2010; HANCOCK, YORK & ROWE, 1997).

A capacidade de sorção de água, ou higroscopicidade, também deve ser considerada. A umidade é um fator que influencia na estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos. Ela assume papel significativo nas características reológicas do produto, essenciais no desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida (CHAVES; COSTA; FREITAS, 2009).

Ainda sobre características intrínsecas ao fármaco, Semeniuk e colaboradores (2008) evidenciaram, por técnicas de cristalografia e difração de raios-X, a projeção da estrutura cristalina e interações intermoleculares do monocrystal do sulfato de HCQ. Conforme o estudo, cada um dos átomos de nitrogênio da base livre é um doador de prótons nas ligações de hidrogênio intermoleculares com os átomos de oxigênio do ânion sulfato. Além disso, por se tratar de um sal de sulfato, é possível observar a formação de “supermoléculas” contendo

dois cátions e dois ânions, a base livre do fármaco e o sulfato, respectivamente. O trabalho ainda compara a presença do grupo hidroxila, em relação à sua ausência no fosfato de cloroquina onde foi sugerido que a adição de mais um doador de próton parece não promover grandes alterações na conformação da molécula, no entanto aumenta a interação desta com o receptor transmembranar do parasita (receptor putativo) (KOYAMA, 2012).

A difração de raios-X é uma técnica cristalográfica na qual um composto cristalino fornece um perfil de difração característico, constituído por picos, equivalentes às cristas em fase da radiação incidente. É possível identificar a forma cristalina e o grau de cristalinidade da amostra a partir do padrão do difratograma e da área total sob os picos de difração (SANTOS, 2011; SANTOS, 2008; CAO, GUO & PING, 2005)

Sobre a formação do sal, sugere-se que síntese do sal de sulfato deva-se a dois parâmetros: à solubilidade e ao ponto de fusão, intrínsecos ao fármaco como base livre. Em geral, sais de ácidos ou bases orgânicas possuem maior solubilidade em água do que suas correspondentes formas livres, desde que não seja observado efeito de íon-comum. Em relação à HCQ, sua solubilidade em água foi mensurada através de ALOGPS. O resultado obtido – $2,61.10^{-2}$ g/L – é considerado como praticamente insolúvel, segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (UNIVERSITY OF ALBERTA, 2013; BRASIL, 2010; SWEETANA & AKERS, 1996).

Quanto ao ponto de fusão, fármacos destinados à forma farmacêutica comprimido devem possuir elevado valor para tal parâmetro (superior a 80°C, pelo menos). Isso ocorre porque, geralmente, fármacos com baixo ponto de fusão exibem deformações plásticas que podem resultar na aglomeração de partículas e, por consequência, alterar as propriedades de fluxo e compressibilidade, impactando negativamente na uniformidade de dose, desintegração e taxa de dissolução. Além disso, a própria metodologia de obtenção de comprimidos pode acarretar problemas em relação à temperatura, como a fusão do fármaco, devido a energia aplicada na pressão que é exercida para efetuar a compressão ou a secagem em estufa de um granulado obtido por via úmida. Contudo, o baixo valor do ponto de fusão da base livre do fármaco (90°C), poderia ser um impasse durante o desenvolvimento de obtenção de formas farmacêuticas sólidas (VERBEECK et al, 2006; GLANZNER & SILVA, 2010; UNIVERSITY OF ALBERTA, 2013).

Visando determinar o ponto de fusão, outra propriedade física inerente ao fármaco, as técnicas de análise térmica são comumente utilizadas. Entre elas, destacam-se: a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a termogravimetria (TG). O DSC permite a detecção quantitativa de todos os processos que requerem ou produzem energia. Este método tem

grande importância nos estudos de pré-formulação, uma vez que fornece informações sobre possíveis interações entre os diversos componentes de uma formulação. O TG avalia a variação de massa de uma amostra, resultado de um evento térmico. Essa variação é, frequentemente, em função da temperatura ou em função do tempo, à temperatura constante (SANTOS, 2011; ROLIM, 2010).

Após identificação inicial da matéria-prima, o estudo de pré-formulação é passo consequente. No caso de matéria-prima sólida, faz-se necessário realizar completo estudo acerca das características reológicas: escoamento e deformação quando submetido à tensão. Nessa fase de investigações e desenvolvimento de formulações, as medições reológicas são utilizadas para definir diversos parâmetros, entre eles: velocidade de escoamento, facilidade de deslizamento quando na maquinaria de compressão, manutenção da forma farmacêutica. Assim como os fatores intrínsecos supracitados, outras especificidades inerentes à matéria-prima são determinantes na composição do fenômeno da reologia, pode-se destacar: tamanho de partícula e de poros, área superficial e, por consequência, propriedades de fluxo (WOOD, 2001).

A redução do tamanho de partícula conduz ao aumento da área de superfície específica do pó, ou seja, da área de superfície por unidade de peso. As velocidades de dissolução, de absorção do fármaco e a uniformidade de conteúdo e estabilidade da forma farmacêutica são dependentes do grau de variação do tamanho de partícula, da distribuição de tamanho e das interações entre as superfícies sólidas (STANFORTH, 2005).

A área superficial dos sólidos é uma das principais características de pós finos. Esta é definida como a superfície interna presente no material por unidade de massa ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) e pode apresentar grandes variações em virtude da forma, tamanho da partícula e porosidade. A área superficial específica é inversamente proporcional ao diâmetro médio do poro. Isto é, uma grande superfície específica indica a presença de pequenos poros, enquanto pequenos valores são característicos de materiais macroporosos de corpos não porosos (LOWELL & SHIELDS, 1991; SVAROVSKY, 1987).

O tamanho da partícula e a distribuição do tamanho de partículas têm influência sobre as propriedades de fluxo de um pó. Os fatores que determinam tal fluidez são: tamanho da partícula, distribuição do tamanho de partícula, morfologia da partícula, teor de umidade e natureza higroscópica do material. Entretanto, a principal consideração é o grau de aglomeração das partículas. Partículas pequenas aderem-se muito mais fortemente entre si do que partículas grandes, logo pós finos apresentam uma maior tendência à aglomeração. A

fluidez de um pó aumenta com o aumento do tamanho da partícula (PORTE, LEÃO & PORTE, 2011).

Diversas metodologias podem ser aplicadas para delinear características intrínsecas às matérias-primas. Isso é ainda mais importante quando se trata de insumos farmacêuticos ativos. Nesse caso, além dos parâmetros citados até então, é importante investigar: o teor de umidade residual (principalmente em materiais sólidos pulverulentos); as características das partículas e aglomerados e, conseqüentemente, suas propriedades reológicas; a compatibilidade do fármaco com os outros componentes da formulação. Essas investigações fornecem os subsídios necessários para a realização dos passos consequentes do setor produtivo: os estudos de pré-formulação e de estabilidade.

O estudo de pré-formulação pode ser definido como a completa investigação das propriedades físico-químicas do insumo farmacêutico ativo, isolado ou combinado com os demais excipientes que compõem uma formulação. O objetivo desse estudo é fornecer informações úteis o bastante para obter formas farmacêuticas seguras, estáveis, eficazes e com biodisponibilidade adequada. É, talvez, a etapa limitante do desenvolvimento de produtos e requer atenção especial de todo o setor envolvido nesse processo. Portanto, faz-se necessária a aplicação da filosofia de *quality by design*, uma vez que, deve-se planejar e eliminação e/ou redução de interferências e de dispêndio de recursos (MORETTO & CALIXTO, 2009).

O estudo de estabilidade (EE) é etapa fundamental na garantia da segurança e qualidade de todo e qualquer medicamento. A partir desse estudo, evidências podem ser obtidas sobre o comportamento de um medicamento ao longo do tempo, frente à influência de determinados fatores, tais como: temperatura, umidade, luz e oxigênio reativo. Com isso, pode-se estabelecer o prazo de validade de tal produto, bem como as condições essenciais de transporte e armazenamento (SEHRAWAT, MAITHANI & SINGH, 2010; ICH, 2003).

Estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o insumo farmacêutico ativo mantém a sua integridade físico-química, dentro dos limites especificados, desde o momento do seu fabrico até a sua estocagem e administração. Outro conceito define estabilidade como o período de tempo em qual a potência do produto farmacêutico está reduzida a não mais que 10%, desde que os produtos oriundos dessa alteração estejam todos qualificados e, muitas vezes, quantificados (SILVA et al, 2009; STULZER & SILVA, 2006).

Os EE devem ser realizados em condições similares às condições ambientais médias encontradas nos locais onde o medicamento em questão será comercializado. Essa é a classificação harmonizada adotada por diversos órgãos, como o *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2003).

No Brasil, há recente legislação sobre EE. A RDC nº 45 de 9 de agosto de 2012 dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFA). Segundo ela, o EE deve avaliar todas as características do IFA que são susceptíveis a alterações durante toda a sua vida útil – período compreendido desde a fabricação e incorporação à forma farmacêutica até a tomada do medicamento que o contém. Portanto, a mencionada resolução objetiva prever, determinar ou acompanhar a data de reteste ou prazo de validade de IFAs (BRASIL, 2012).

Outra publicação referente à estabilidade precedeu a RDC nº 45. A resolução específica RE 01 de 29 de julho de 2005 – que revogou a resolução RE nº 398, de 12 de novembro de 2004 –, no entanto, traz em anexo o “Guia para a realização de estudos de estabilidade”, não contemplando o princípio ativo utilizado na formulação. Isso justifica a importância da constante atualização da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) no que tange os EE e a garantia de segurança e eficácia de medicamentos. Recentemente a ANVISA publicou a consulta pública CP nº 11, de 23 de janeiro de 2012 requisitando a apresentação de críticas e sugestões relativas à proposta de nova RDC que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares. Entretanto, até o momento, nada foi efetivado (BRASIL, 2012; BRASIL, 2005).

Segundo a RDC nº 45, A data de reteste ou prazo de validade do IFA devem ser determinados por estudo de estabilidade de longa duração. Esses devem ser executados bem com àqueles descritos pela RE 01/2005. Os EE são classificados em: acelerado, de longa duração e de acompanhamento (BRASIL, 2012; BRASIL, 2005).

O estudo acelerado é projetado para aumentar a velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no IFA pela utilização de condições drásticas de armazenamento (umidade relativa e temperatura), com o propósito de monitorar as reações de degradação e elucidar as condições necessárias para a execução do estudo de longa duração. É possível estabelecer data de reteste ou prazo de validade provisório de no máximo 24 (vinte e quatro) meses com resultados mínimos de seis meses de estudo acelerado ou doze meses de estudo de longa duração (BRASIL, 2012).

O estudo de longa duração é realizado em condições normais de armazenamento, com o objetivo de confirmar dados obtidos no estudo acelerado. São projetados para verificação das características físicas, químicas, biológicas e, quando aplicáveis, microbiológicas de um IFA. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar a data de reteste ou o prazo de

validade, além de recomendar as condições de armazenamento. Tal estudo deve ser realizado de acordo com as condições climáticas do país em que se pretende registrar o produto, considerando que o mundo é classificado em quatro grandes zonas. Os testes de controle de qualidade são realizados normalmente a cada 3 meses no primeiro ano e a cada 6 meses no segundo, a partir da data de fabricação do lote (BRASIL, 2012; BRASIL, 2005; ICH, 2003; WHO, 1996).

O estudo de acompanhamento é realizado após concessão do registro ou notificação do IFA, tendo por objetivo verificar a manutenção das suas características, conforme os resultados obtidos nos estudos preliminares. Desta forma, assegura-se que o foi adotado o controle das alterações sofridas pela matéria-prima, além de fornecer subsídios para o estabelecimento de novas datas de reteste (BRASIL, 2012).

Deve ser avaliada, também, a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação (PD), utilizando-se metodologia adequada e validada. Portanto, deve-se recorrer ao uso de: testes de degradação forçada, testes confirmatórios de estabilidade e métodos indicativos de estabilidade (MIE) (BRASIL, 2012).

Os estudos de degradação forçada de fármacos são definidos como testes realizados em condições superiores àquelas utilizadas em estudos de estabilidade acelerada e têm o objetivo de avaliar a estabilidade intrínseca da molécula e fornecer informações sobre mecanismos de degradação e possíveis subprodutos dessas reações (ALSANTE, MARTIN & BAERTSHI, 2003; KLICK, et al., 2005).

Tais estudos são importantes etapas dos processos de pré-formulação e de desenvolvimento de métodos analíticos, pois ajudam a avaliar a estabilidade intrínseca de um IFA por aplicação deliberada de estresse para forçar degradação. A degradação da amostra é induzida através do aumento da temperatura, do aumento da umidade (quando relevante), da exposição a condições variadas de pH ou à luz UV-visível intensa (fotoestabilidade) ou pela adição de outros reagentes (por exemplo, ácidos, bases, peróxidos). Estudos de degradação forçada são descritos como testes de estresse (SEHAWAT, MAITHANI & SINGH, 2010)

A hidrólise parece ser a reação mais frequentemente observada. Isso ocorre devido a predominância da água como solvente universal. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, deve ser levado em consideração o pH do meio, uma vez que íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação. Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica, hidróxido de sódio. Há poucos relatos na literatura sobre a hidrólise realizada em pH neutro. Nessa condição, a taxa de decomposição é lenta, o que é

compreensível, pois reações em pH neutro são não-catalíticas e, portanto, podem ser necessários períodos muito longos sob condições de temperatura extremas, para conseguir quantidades suficientes de produtos de degradação (SILVA, et al., 2009; SINKO, 2008; ANSEL, LOYD & POPOVICH, 2007; SINGH & BAKSHI, 2000).

A presença de oxigênio, quando ativado por traços de catalisadores, como íons metálicos, por exemplo, leva à auto-oxidação dos constituintes. A degradação oxidativa é bastante evidenciada em esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. Esse parece ser muito mais popular para o propósito que qualquer outro agente oxidante. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (SILVA, et al., 2009; FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Menos frequente, a fotólise deve também ser levada em consideração. Estudos de fotoestabilidade são conduzidos a fim de quantificar a extensão pelas quais as reações induzidas pela luz afetam as formulações dos medicamentos. Em alguns casos, determinar os mecanismos de fotoreações dos fármacos e de outros componentes que compunham o produto avaliado. Para fins de registro de IFAs, no Brasil, deve ser realizado estudo de fotoestabilidade com o objetivo de demonstrar que a exposição à luz não resulta em alterações significantes no princípio ativo. Nesse caso, o estudo deve prover de estudos de degradação forçada e testes confirmatórios. A não apresentação de estudo de fotoestabilidade deve vir acompanhada de justificativa técnica com evidência científica de que o IFA ativo não sofre degradação em presença de luz (BRASIL, 2012; PIECHOCK & THOMA, 2007).

Todas as condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizada. Para isso, as condições forçadas de degradação utilizadas durante o desenvolvimento do método, como a concentração das soluções hidrolíticas e o tempo de exposição, devem ser estabelecidas de tal forma que se obtenha um nível de degradação desejada, em média 10 a 20% (SEHRAWAT, MAITHANI & SINGH, 2010; HUYNH-BA, 2009; SILVA, et al., 2009; BAERTSCHI, 2005; SINGH & BAKSHI, 2000).

As figuras 5 e 6 (ambas adaptadas de SINGH & BAKSHI, 2000) trazem representações gráficas de condutas que podem ser adotadas para realizar estudo de degradação forçada, utilizando hidrólise e oxidação como exemplos de reações degradativas.

Figura 5. Esquema representativo da metodologia de hidrólise degradativa.

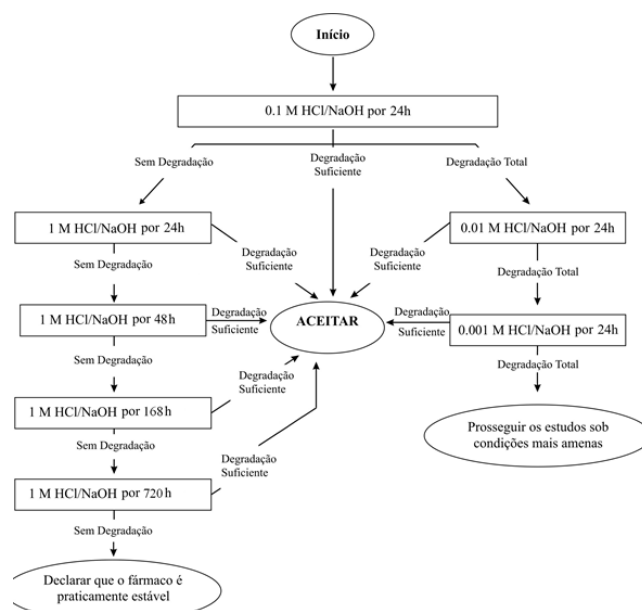
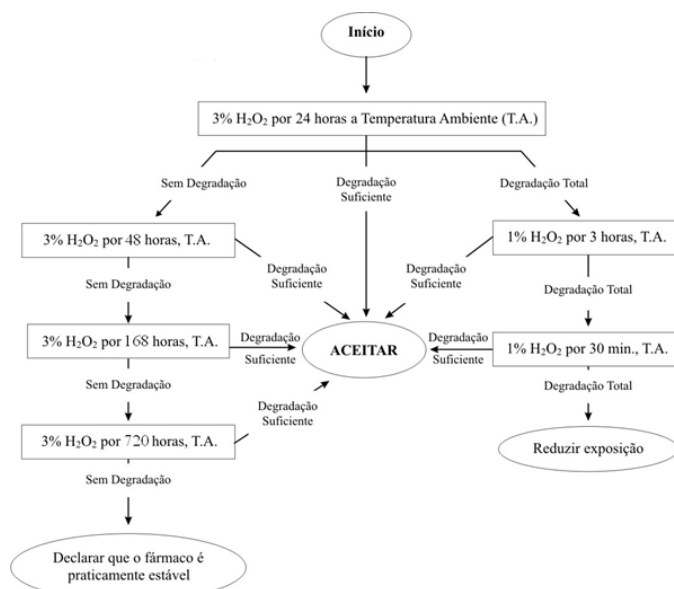


Figura 6. Esquema representativo da metodologia de oxidação degradativa.



O ICH e a ANVISA regulamentam que, de acordo com a dose máxima ingerida pelos pacientes, seja analisado a necessidade de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação no decorrer dos estudos de estabilidade, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Limites dos produtos de degradação expressos de acordo com a porcentagem de fármaco.

	Dose máxima diária	Limites
Limites de Notificação	$\leq 1\text{g}$	0,10%
	$> 1\text{g}$	0,05%
	$< 1\text{mg}$	1,00%
Limites de Identificação	1mg – 10mg	0,50%
	$> 10\text{mg} - 2\text{g}$	0,20%
	$> 2\text{g}$	0,10%
	$< 10\text{mg}$	1,00%
Limites de Qualificação	10mg – 100mg	0,50%
	$> 100\text{mg} - 2\text{g}$	0,20%
	$> 2\text{g}$	0,15%

Muito pouco se conhece sobre a estabilidade e outras informações do campo da tecnologia farmacêutica acerca do fármaco sulfato de HCQ. Oficialmente, nos compêndios oficiais britânico e americano, não há menção sobre a estabilidade da hidroxicloroquina no que diz respeito a impurezas e produtos de degradação (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008; USP, 2010, pág. 2592-3). Entretanto, alguns autores evidenciaram a existência de substâncias correlacionadas a partir de estudos de degradação forçada, podendo caracterizá-los, qualitativa e quantitativamente, através de métodos indicativos de estabilidade.

Tønnesen e colaboradores (1988) irradiaram soluções do fármaco em água e em isopropanol, utilizando CLAE preparativo para isolamento de impurezas. As amostras seguiram, então, às análises de RMN e Espectrômetro de Massa (EM) (com ionização por isobutano). O isopropanol foi escolhido como o meio de reação para o isolamento dos produtos de degradação, uma vez que os padrões de degradação de hidroxicloroquina nos dois solventes mostraram-se qualitativamente idênticos e com menor tempo de exposição. Após apenas 5 horas de exposição, a amostra irradiada em isopropanol apresentou cromatograma, evidenciando quatro diferentes impurezas (IMP): IMP-2 (desetil-HCQ), IMP-3 (N-desidroxietil-HCQ), IMP-4 (dímero de HCQ) e IMP-5 (desamina-HCQ).

Mais tarde, Dongre e colaboradores (2009) realizaram a identificação e caracterização de duas impurezas relacionadas à síntese do fármaco: a já citada IMP-2 e a IMP-1 (HCQ-N-quaternária). A metodologia utilizada consistia em um enriquecimento das impurezas do fármaco, submetendo-o a uma solução de diclorometano a 30°C por 48 horas. Em seguida, o

solvente foi retirado a partir de destilação à vácuo e as impurezas seguiram a um processo de CLAE semi-preparativo. A identificação e caracterização das substâncias foi possível apenas pelo uso de técnicas hifenizadas, como CLAE-IT-MS seguida de análise ESI-TOF e RMN (^1H , ^{13}C , DEPT e 2D) do fármaco e das impurezas isoladas.

Mais recentemente, Saini e Gulshan (2013), em um *short communication*, realizaram o primeiro estudo de degradação forçada propriamente dito. Este era baseado nos guias ICH Q1A e ICH Q1B, para a realização dos estudos de degradação forçada e de fotoestabilidade, respectivamente. O trabalho alcançou sucesso no que se propunha: conduzir o estudo de degradação forçada, identificando todos os possíveis produtos de degradação oriundos das diferentes reações de hidrólise, oxidação, fotólise e calor seco.

Os autores decidiram modificar as condições cromatográficas de Dongre e colaboradores (2009) para aumentar a resolução dos picos, tanto do fármaco quanto das impurezas. Praticamente todas as condições propostas apresentaram a estabilidade do fármaco, exceto a solução alcalina mantida nas condições de fotólise. Esta apresentou 6 produtos de degradação (Figura 7), 4 inéditos (I-IV) e 2 semelhantes as estruturas de impurezas já conhecidas. O interessante é que os autores evidenciaram que os produtos de degradação III-VI permanecem com o grupo cromóforo do fármaco intacto, uma vez que eles mantêm o mesmo padrão do espectro de absorção UV. O mesmo não acontece com os PD I e II, que apresentam mudanças no grupo cromóforos benzenoides. Assim, foi possível caracterizar a maioria dos produtos de degradação, exceto o VI, o qual ofereceu poucos resultados no espectro de massa; sendo o III uma impureza já conhecida, enquanto os I, II, IV e V foram novos produtos de degradação elucidados pelos autores.

Para a obtenção desses resultados, os autores dispuseram das seguintes técnicas de caracterização: LC-PDA, +ESI-MSn e LC-MS-TOF; sendo possível elucidar a mais provável rota de degradação (Figura 8), bem como as características de estabilidade intrínseca ao fármaco.

Figura 7. Estruturas da hidroxicloroquina, suas impurezas e produtos de degradação (adaptado de Saini & Bansal, 2013).

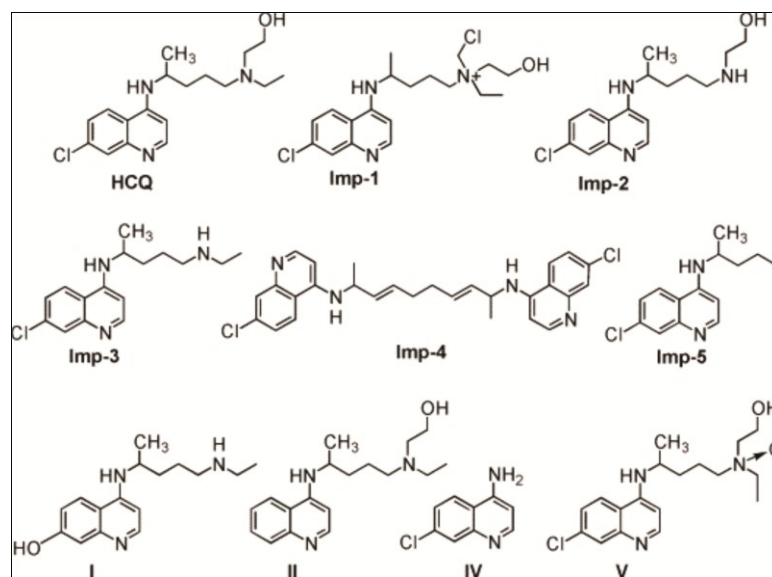
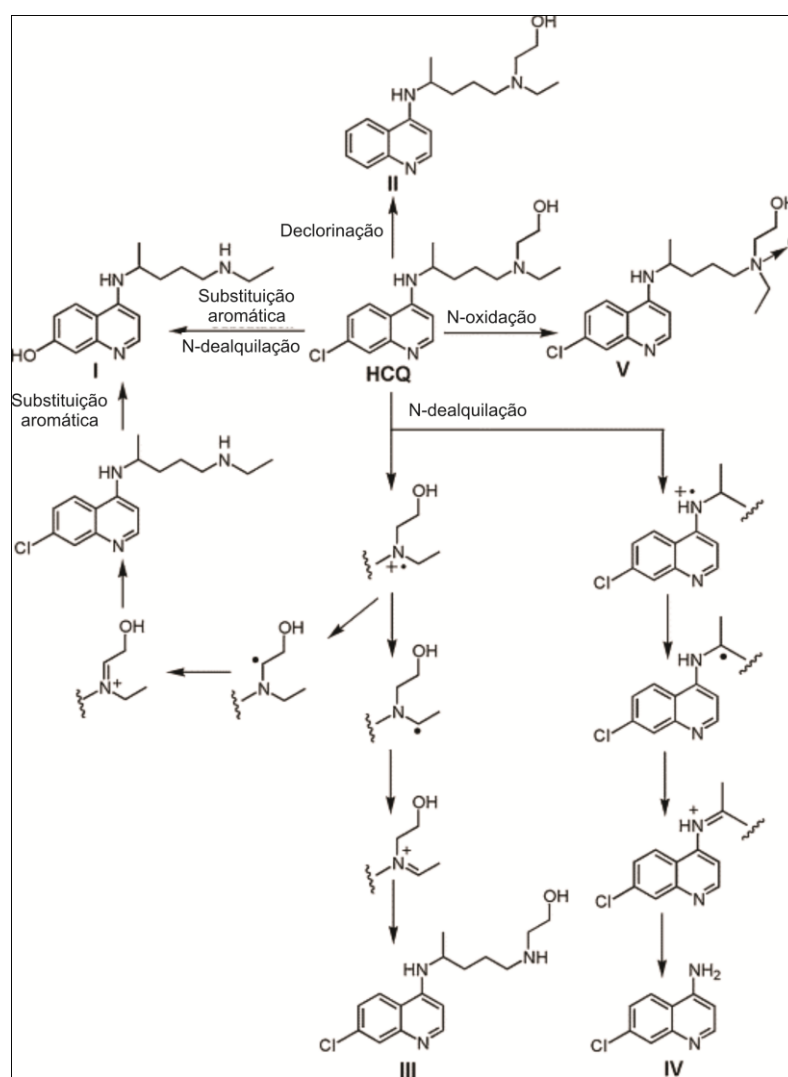


Figura 8. Provável rota degradativa do sulfato de hidroxicloroquina.



Outra forma de avaliar a estabilidade de um fármaco é a termodegradação. Frequentemente é capaz de ser mensurada através de termogravimetria, técnica capaz de avaliar a relação de interdependência da variação de massa que ocorre na amostra – perda ou ganho – em função do tempo (a dada temperatura constante) ou da temperatura (CONCEIÇÃO, 2004).

Pertencente ao ramo das análises térmicas, os métodos térmicos encontram ampla aplicação tanto no controle de qualidade quanto na pesquisa de produtos farmacêuticos, tais como: polímeros, fármacos, argilas. A termogravimetria é essencialmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas em um experimento e este tipo de medida é realizada utilizando-se um equipamento denominado termobalança. Esta consiste na combinação de uma microbalança eletrônica associada a um forno e um programador linear de temperatura, permitindo a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, à medida que a amostra é aquecida ou resfriada (CONCEIÇÃO, 2004; SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

Com o uso de termobalanças e fornos pode-se controlar a atmosfera que circunda a amostra. Portanto, é possível trabalhar com atmosfera estática ou dinâmica à pressão ambiente, sob pressão ou a vácuo. Os gases utilizados podem ser inertes (nitrogênio, argônio), oxidantes (oxigênio) ou corrosivos (WENDLANT, 1986 e CONCEIÇÃO, 2004).

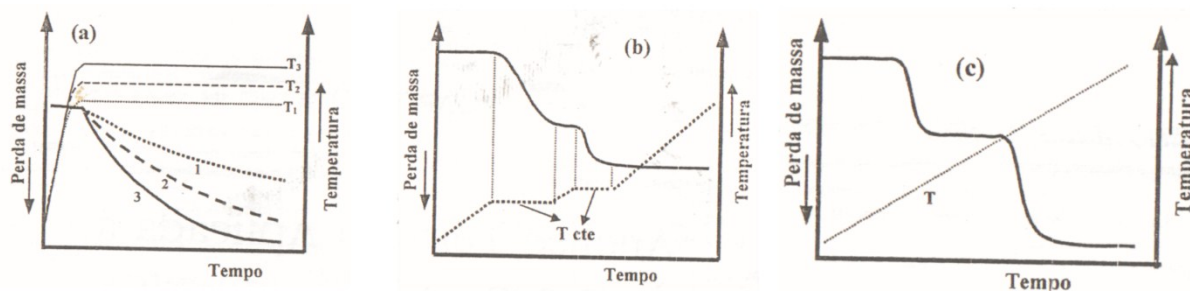
A perda de massa pode ser relacionada com muitos fenômenos, como desidratação, sublimação, decomposição. Portanto, os resultados obtidos por meio da técnica podem servir para diferentes aplicações, tais como: estudo de decomposição e estabilidade térmica de fármacos, polímeros, alimentos, materiais explosivos; estudos sobre corrosão de metais em atmosfera controlada, em faixas amplas de temperatura; estudos sobre a velocidade de evaporação de líquidos e sublimação de sólidos; estudos sobre desidratação, higroscopicidade, absorção, adsorção, desadsorção, determinação do teor de umidade, fração volátil e do teor de cinzas de vários materiais; estudo cinético de reações, inclusive de reações no estado sólido e descoberta de novos compostos químicos; determinação da pureza e da estabilidade térmica de reagentes analíticos, inclusive padrões primários e secundários. (IONASHIRO & GIOLITO, 2005; CONCEIÇÃO, 2004).

Basicamente, a termogravimetria classifica-se em: dinâmico, isotérmico e quase isotérmico (WENDLANDT, 1986), conforme ilustrado pela figura 9.

No método dinâmico, a temperatura da amostra varia de maneira predeterminada, preferencialmente, a uma razão de aquecimento ou resfriamento linear. É também chamado

de convencional, quando se utiliza o termo termogravimetria normalmente refere-se à termogravimetria dinâmica (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; WENDLANT, 1986).

Figura 9. Curvas típicas dos principais métodos termogravimétricos: (a) isotérmico; (b) Quase isotérmico e (c) dinâmico.



No método isotérmico, a variação de massa da amostra é registrada em função do tempo, mantendo-se a temperatura constante, sendo geralmente utilizado em trabalhos cinéticos (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; WENDLANT, 1986).

No método quase-isotérmico, a partir do momento em que começa a perda de massa da amostra, a temperatura é mantida constante até que a massa se estabilize novamente, neste momento recomeça-se o aquecimento e este procedimento pode ser repetido em cada etapa da decomposição (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; WENDLANT, 1986).

No método termogravimétrico dinâmico (convencional), a temperatura varia de maneira predeterminada, preferencialmente a uma razão de aquecimento/resfriamento linear (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; WENDLANT, 1986).

Essas informações são necessárias quando se pretende estudar cinéticas de degradação. Com base nas medidas termogravimétricas, pode-se avaliar a estabilidade térmica de um fármaco. O estudo da cinética de degradação, fundamental para o estudo de fármacos e medicamentos, foi demonstrado inicialmente por Garrett & Carper (1955). Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; NUDELMAN, 1975).

Segundo este método, os valores da constante (k) de degradação de fármacos são obtidos plotando-se em um gráfico da concentração em função do tempo a diferentes temperaturas, por exemplo. Assim, os logaritmos das velocidades de reações nas diferentes temperaturas são plotados por sua vez, em função das temperaturas absolutas, extrapolando-se a linha reta resultante até a temperatura ambiente, podendo-se assim determinar a validade do

fármaco ou medicamento nas condições de armazenamento normais (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; NUDELMAN, 1975).

Uma segunda abordagem para avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos envolve a cinética não-isotérmica, introduzida por Roers em 1963. A energia de ativação, as velocidades de reação e a previsão da estabilidade são obtidas mediante a um único experimento programando a variação de temperatura a uma velocidade determinada, sendo a temperatura e tempo relacionados, mediante a equação:

$$\text{Equação 1. } 1/T = 1/T_0 + at$$

Onde T_0 é a temperatura inicial, T a temperatura analisada, a o recíproco da constante de velocidade de aquecimento e t o tempo. A qualquer tempo durante o experimento, a equação de Arrhenius para o tempo zero e o tempo t pode ser expressa:

$$\text{Equação 2. } \ln K_t = \ln K_0 - E_a/R (1/T_t - 1/T_0)$$

Substituindo a equação 01 na Eq. 02, pode-se obter:

$$\text{Equação 3. } \ln K_t = \ln K_0 - E_a/R . at$$

Uma vez que a temperatura está em função do tempo, t , a determinação da estabilidade, K_t , é feita diretamente sobre a faixa de temperatura do experimento, porém existem várias contestações sobre a veracidade dos dados na extrapolação para a temperatura ambiente de constantes calculadas por este modelo cinético (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011).

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A ordem de reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação

segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo neperiano da concentração ($\ln C$) em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta (MATOS, MERCURI & BARROS, 2011; NUDELMAN, 1975).

Não há, atualmente, informações na literatura que abordam o comportamento térmico e a estabilidade da forma sólida do sulfato de HCQ.

O desenvolvimento de métodos analíticos capazes de mensurar a estabilidade de um fármaco frente às condições de transporte e armazenamento faz-se ainda mais necessário quando o fármaco em questão trata-se de uma mistura racêmica.

Cerca de 25% dos agentes terapêuticos são obtidos por vias sintéticas e administrados ao homem como misturas racêmicas. Entretanto, as propriedades farmacocinéticas dos enantiômeros podem diferir em razão da enantiosseletividade dos processos de absorção, distribuição, metabolismo ou excreção do fármaco. Em alguns casos, as diferenças farmacológicas entre os enantiômeros são claras, o que conduz à utilização clínica de um único enantiômero. Por exemplo, a D-penicilamina é administrado na forma do enantiômero puro para o tratamento da AR, pois seu enantiomorfo, L-penicilamina, provoca efeitos colaterais inaceitáveis, incluindo neurite óptica (IREDALE, FIEGER & WAINE, 1993).

Por ser comercializado na forma racêmica, o uso do sulfato de HCQ requer atenção. A utilização de misturas racêmicas pode contribuir para a toxicidade ou efeitos adversos do fármaco, particularmente quando estes estão associados com isômeros farmacologicamente menos ativos ou inativos. Exemplo prático: a talidomida. Apenas um dos seus enantiômeros é capaz de promover sedação. Quando metabolizada, a molécula sofre racemização *in vivo*, e apenas a forma mais tóxica é absorvida, responsável pelas famigeradas deformações congênitas (CARDOSO, 2006; LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001; CALDWELL, 1996; CALDWELL, 1995).

Sendo a indústria farmacêutica principal incentivadora dos estudos dos fármacos quirais, essa questão passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos. O uso desses fármacos enantiomericamente puros pode ser vantajoso por possibilitar: redução na dose administrada, simplificação na relação dose-resposta, redução na toxicidade devido ao isômero inativo. Faz-se então necessário melhor esclarecimento sobre as propriedades físico-químicas e perfis estereosseletivos – cinéticos e dinâmicos – de fármacos quirais. Por essa razão, fármacos já comercializados como racematos vêm sendo resgatados

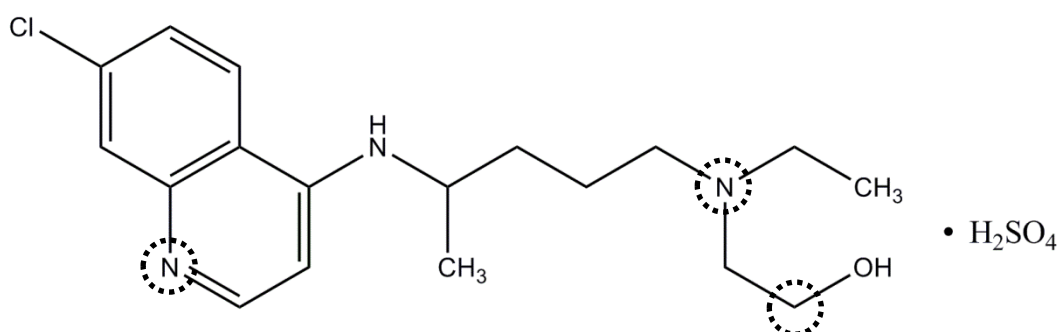
em exaustivos estudos buscando avaliar se há vantagem em se produzir o fármaco em seu enantiômero puro mais efetivo e/ou eficaz (CARDOSO, 2006; CALDWELL, 1995).

Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de separar isômeros em concentrações conhecidas, quer seja em preparações biológicas ou farmacêuticas, tornou-se requisito essencial no controle de qualidade e farmacocinético (CARDOSO, 2006; VERLEYSSEN & SANDRA, 1998).

Grande parte dos estudos de separação enantiomérica, até então, têm sido desenvolvida empregando técnicas de eletroforese capilar e, mais comumente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para o sucesso desta última, três procedimentos podem ser utilizados: derivação quiral, adição de aditivo quiral à fase móvel e emprego da fase estacionária quiral (coluna quiral). (WANG et al., 2012; DONGRE et al., 2009; TACHIBANA & OHNISHI, 2001; FRIED & WAINER, 1997; TØNNESEN et al., 1988).

A derivação quiral envolve a reação da mistura de enantiômeros com um agente derivatizante quiral, enantiomericamente puro, para formar dois derivados diastereoisoméricos. Os diastereoisômeros podem, então, ser separados usando CLAE no modo de eluição fase reversa ou fase normal. No caso do sulfato de HCQ, há três sítios de formação de diastereoisômeros: o nitrogênio aromático, o nitrogênio terciário alifático e o grupo hidroxila; como demonstrado na figura 10 (DONGRE et al., 2009; CARDOSO, 2006).

Figura 10. Sítios de formação de diastereoisômeros do sulfato de hidroxicloroquina.



O uso do (+)-di-O-acetil-L-tartárico (DATAAN) como reagente de derivatização foi primeiramente reportado por Lindner e colaboradores (1991). O trabalho contempla o uso de DATAAN para a separação dos enantiômeros de vários antagonistas β -adrenoceptores, incluindo propranolol. Ao invés da função amino, a DATAAN reage preferencialmente com o grupo hidroxila dos β -bloqueadores para formar ésteres, o que justifica o seu uso para o

sulfato de HCQ. Estudos ainda demonstram o uso de outros agentes de derivatização, como o S-(+)-1-(1-naftil)-isocianato de etilo e S-(+)-1-(1-fenil)-isocianato de etilo (BROCKS, PASUTTO & JAMALI, 1992).

Na adição de aditivo quiral – segundo mecanismo de separação enantiomérica –, um seletor quiral é adicionado à fase móvel. Os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o analito e a fase móvel, acrescida do seletor quiral, também podem ser separados por CLAE no modo de eluição fase reversa ou fase normal (CARDOSO, 2006; BONATO, JABOR & GAITANI, 2005).

O método que utiliza coluna quiral – terceiro e último método aqui apresentado – parece ser o mais aplicado. O procedimento consiste em utilizar um seletor quiral quimicamente ligado à fase estacionária. Métodos recentes utilizam a α_1 -glicoproteína ácida como esse agente ligado. Tal sistema é capaz de interagir com os dois enantiômeros do analito, formando complexos diastereoisoméricos transitórios através de ligações de hidrogênio, interações π - π , complexos de inclusão e impedimento estérico, ocasionando, consecutivamente, a enantiosseparação (SINGH, KEDOR-HACKMANN & SANTORO, 2006; CARDOSO, 2006; SNYDER, 1997; MCLACHLAN, TETT & CUTLER, 1992; IREDALE & WAINER, 1992).

O grande impasse encontrado quando no desenvolvimento de métodos analíticos de separação enantiomérica reside na obtenção dos compostos isolados e com alto grau de pureza. Substâncias químicas de referência de fármacos, metabólitos e seus respectivos isômeros são caros ou inexistentes. Portanto, alguns estudos utilizam padrões internos. Ofori-Adjei e colaboradores (1986) incubaram os isômeros (R) e (S) da cloroquina separadamente com microsomos de fígado humano, *in vitro*, produzindo enantiômeros opticamente puros de metabólitos, subsequentemente utilizados como padrão.

No caso da HCQ, a mistura racêmica (rac-HCQ) contém dois isômeros: (-)-(R)-HCQ e (+)-(S)-HCQ. A metabolização biológica desse fármaco promove a formação de três metabólitos ativos principais: desetilcloroquina (DCQ), desetilhidroxicloroquina (DHCQ) e bisdesetilcloroquina (BDCQ), todos eles, compostos quirais (DUCHARME et al., 1995; WEI et al., 1995; IREDALE, FIEGER & WAINE, 1993; McCHESNEY, 1983).

Os métodos descritos para a análise enantiosseletiva da HCQ e de seus principais metabólitos, utilizando técnicas por CLAE, apresentam duas etapas de análise. Os analitos compreendem: preparações farmacêuticas, urina, plasma e sangue total.

Por se tratar de uma mistura racêmica, não é observada rotação líquida da luz polarizada no plano quando um polarímetro é utilizado. Este aparelho mede o efeito da luz

plano-polarizada sobre compostos opticamente ativos. O princípio da técnica é baseado na interação do equipamento com um campo elétrico, de modo que o campo elétrico da luz que emerge do polarímetro está oscilando em apenas um plano (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

3.2 Quality by design

Quality by Design (QbD) foi descrito pela primeira vez por Juran & Godfrei (1998) e aplicado principalmente na indústria automotiva. A premissa fundamental do QbD é o delineamento da qualidade por meio de uma estratégia de otimização visando estabelecer completa compreensão da resposta do sistema de qualidade para determinadas variáveis. Outro objetivo é monitorar a continuidade da qualidade, elaborando estratégias de controle para assegurar cotidianamente essa qualidade.

Recentemente, o *United States Food and Drugs Administration* (FDA) atentou-se à necessidade de se harmonizar um “estado desejado da qualidade”. Em 2003, Bruxelas, o *International Conference on Harmonisation* (ICH) firmou um acordo que abordava a criação de um sistema de qualidade farmacêutica harmonizada aplicável em todo o ciclo de vida do produto enfatizando uma abordagem integrada para a gestão de riscos de qualidade e ciência. Assim, em 2004, o guia foi lançado à consulta pública (ICH, 2009; ECA, 2005).

Visando o desenvolvimento inteligente da indústria farmacêutica, a FDA inicia a defesa da metodologia do QbD na área farmacêutica publicando, em 2008, o ICH Q8(R1) – *Guideline for Industry. Pharmaceutical Development* (ICH, 2008).

Dois anos mais tarde, uma revisão é publicada. A ICH-Q8(R2) – *Guideline for Industry Pharmaceutical Development* apresenta a possibilidade de usar o conhecimento adquirido através da aplicação de métodos científicos e da gestão de riscos de qualidade para o desenvolvimento eficaz de um produto e do seu processo de fabricação. Junto a ICH-Q8(R2), mais duas publicações contribuíram para o incremento do desenvolvimento racional e tecnológico de medicamentos: a ICH-Q9 – *Quality Risk Management* e a ICH-Q10 – *Pharmaceutical Quality System*. A aplicação do conceito de QbD adicionando princípios científicos na obtenção de novas formulações proporciona compreensão total das propriedades das matérias-primas utilizadas e dos produtos acabados (ICH, 2009; ICH, 2008; ICH, 2005).

As diretrizes contemplam ainda o conceito de *Design Space*: o estabelecimento de combinações e/ou interações multidimensionais das variáveis de um processo e de seus

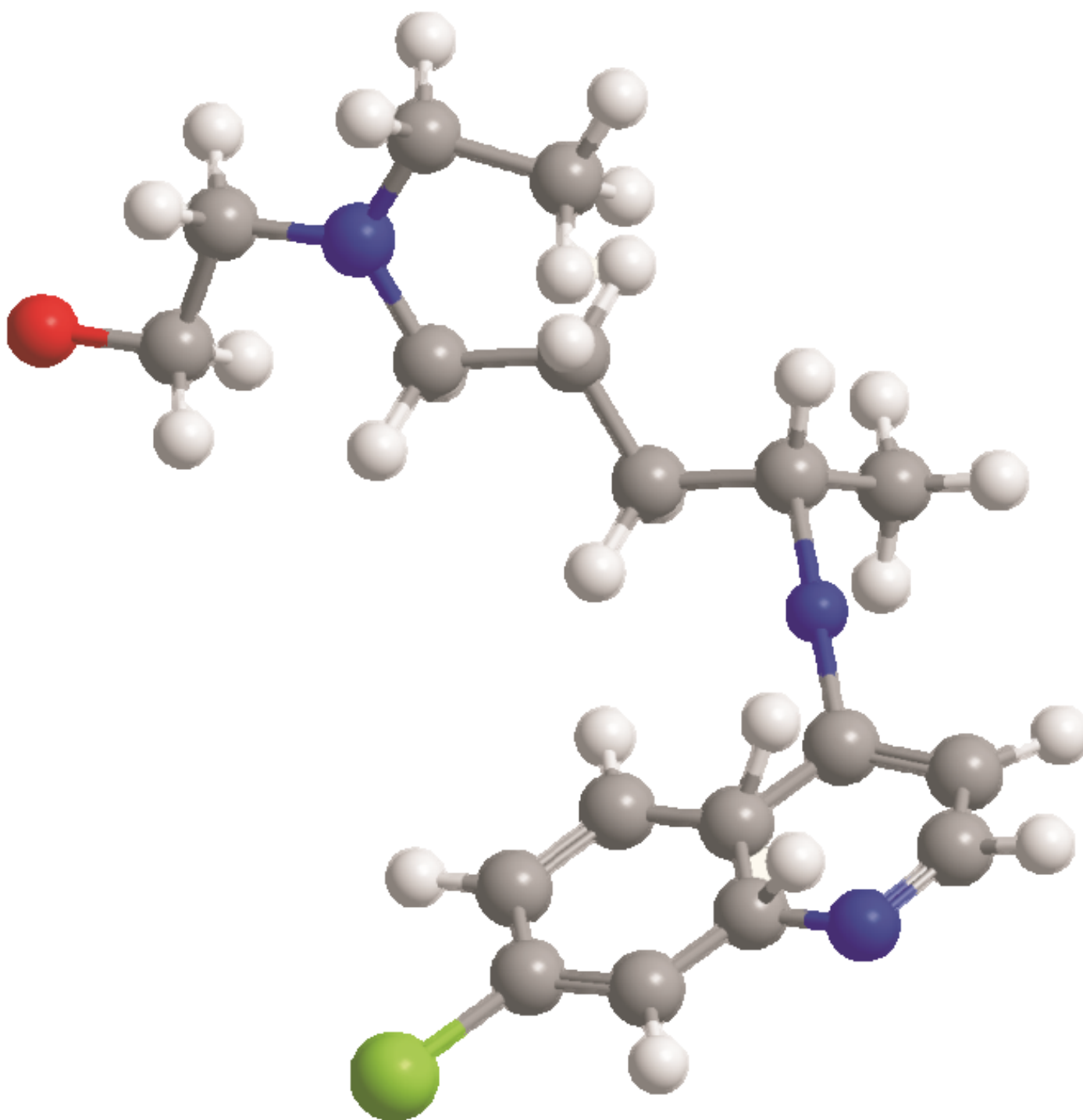
parâmetros, visando proporcionar a garantia de qualidade. Este espaço virtual de concepção é a gama de parâmetros investigados, que se demonstraram viáveis e capazes de obter produtos/métodos eficazes. A FDA recomenda que o design space deve ser determinado a partir da combinação de, pelo menos, três variáveis. Para isso, o *Design of Experiments* (DoE) deve ser utilizado visando determinar o impacto de vários fatores e a sua interação. Em comparação com o método tradicional – um-fator-a-um-tempo –, o DoE reduz drasticamente o número de execuções necessárias para determinar o valor ideal de cada um dos fatores. Isto é feito variando tais valores em paralelo. Esta abordagem determina não apenas os principais efeitos de cada fator, mas também as interações entre os fatores, o que é muitas vezes a chave para grandes avanços (ICH, 2009; BARKER, 2005).

A aplicação do conceito de QbD é bastante abrangente. Ele fornece importantes diretrizes a respeito da modelagem da influência das variáveis da qualidade, do design de experimentos e o aprimoramento contínuo de processos enquanto informações acerca desse são colhidas (ICH, 2009; BARKER, 2005).

Diversas críticas são feitas a essa aplicabilidade. Muitos julgam difícil a utilização de tal conceito em indústrias farmacêuticas, há muito, já consolidadas. Isso, talvez, deva-se à falta de informação sobre a real meta do QbD: a qualidade de um produto. Além disso, ao contrário do que se pensa, a implementação de uma equipe especializada em QbD no setor é de baixo custo ou gera feedback significativamente positivo (ICH, 2009; BARKER, 2005).

Fato que merece atenção: a garantia da qualidade não deve ser aplicada apenas ao produto final, mas também ao desenvolvimento e metodologia utilizadas para a confecção deste. Recentemente, pesquisadores do setor analítico começaram a defender a extensão da filosofia QbD para o desenvolvimento de métodos analíticos e não apenas para processos de fabrico (ICH, 2009; BARKER, 2005).

Alguns dos conceitos são mais aplicáveis que outros. Entretanto, a tecnologia moderna e os novos guias publicados pelos compêndios oficiais vêm criando oportunidades de rever as estratégias utilizadas para obtenção/manutenção dos produtos/processos e para o aperfeiçoamento de métodos analíticos. Portanto, a investigação dessas novas abordagens utilizando QbD é de grande valia (McBRIEN, 2010).



MATERIAL & MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os material e métodos, utilizados durante toda a parte experimental do presente trabalho, estão descritos a seguir.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE APLICAÇÃO DE *QUALITY BY DESIGN* NOS ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

4.1.1 *Material*

O sulfato de HCQ foi adquirido da FAGRON[®] do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX#7 e sintetizado pela indústria Sanofi-Aventis[®], enquanto o padrão analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich[®], lote #022M4749V.

4.1.2 *Aplicação do conceito QbD no estudo de pré-formulação*

Visando o delineamento da qualidade por meio de uma estratégia de otimização, investigações foram estabelecidas a fim de fornecer completa compreensão da resposta para determinadas variáveis. Assim, diversas técnicas analíticas foram realizadas e, apesar de muitas objetivarem os mesmos resultados, a intenção do presente estudo foi avaliar se há corroboração de resultados quando se utiliza metodologias com diferentes princípios e custos. Dessa forma, para traçar o melhor e mais rentável roteiro de atividades de execução do estudo de pré-formulação, a árvore decisória (Figura 11) foi proposta.

4.1.3 *Caracterização a nível molecular*

A seguir estão expostas todas as técnicas de caracterização físico-química que exploram a molécula a nível molecular.

4.1.3.1 Ensaio semi-quantitativo de solubilidade

O ensaio de solubilidade semi-quantitativo do sulfato de HCQ foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, onde 1 grama do fármaco foi submetido aos seguintes solventes: água e solução aquosa de tampão fostato em diferentes pHs, clorofórmio, acetona, álcool etílico, álcool metílico, n-hexano, acetonitrila.

4.1.3.2 Espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV) com transformada de Fourier e do Ultravioleta (UV) e Espectroscopia Raman por transformada de Fourier.

O espectro de infravermelho por transformada de Fourier foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras entre 4000 a 650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} (CHAVES et al., 2013).

Para a obtenção da varredura de 200 a 500 nm por espectrofotometria na região UV utilizou-se espectrofotômetro ultravioleta da marca SHIMADZU® UV-2401 PC e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm.

O espectro de espalhamento Raman por transformada de Fourier foi obtido em espectrômetro Bruker®, modelo Vertex 70 acoplado ao módulo RAM II, tendo como fonte de excitação um laser de Nd:YAG emitindo em 1064 nm, com 150 mW de potência de saída. A resolução espectral foi ajustada em 4 cm^{-1} , e a relação sinal/ruído foi otimizada fazendo-se 100 varreduras na faixa de número de onda de 70 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com detecção em 180 graus.

4.1.3.3 Espectroscopia de Massa (EM) - MALDI-TOF

Os espectrômetros de massa do sulfato de HCQ foram obtidos em espectrômetro de massa MALDI-TOF Autoflex III®. Foi realizada a aquisição em modo refletido positivo, com voltagem de aceleração de 19 kV e faixa de detecção massa-carga entre 200 – 4480. O tempo de voo foi escolhido como método analisador de massas, realizando o processamento dos espectros em software FlexAnalysis Versão 3.0 (Bruker Daltonics®). Para a elucidação de fragmentos da molécula, múltiplas ionizações foram efetuadas no pico majoritário do espectrograma de massa obtido.

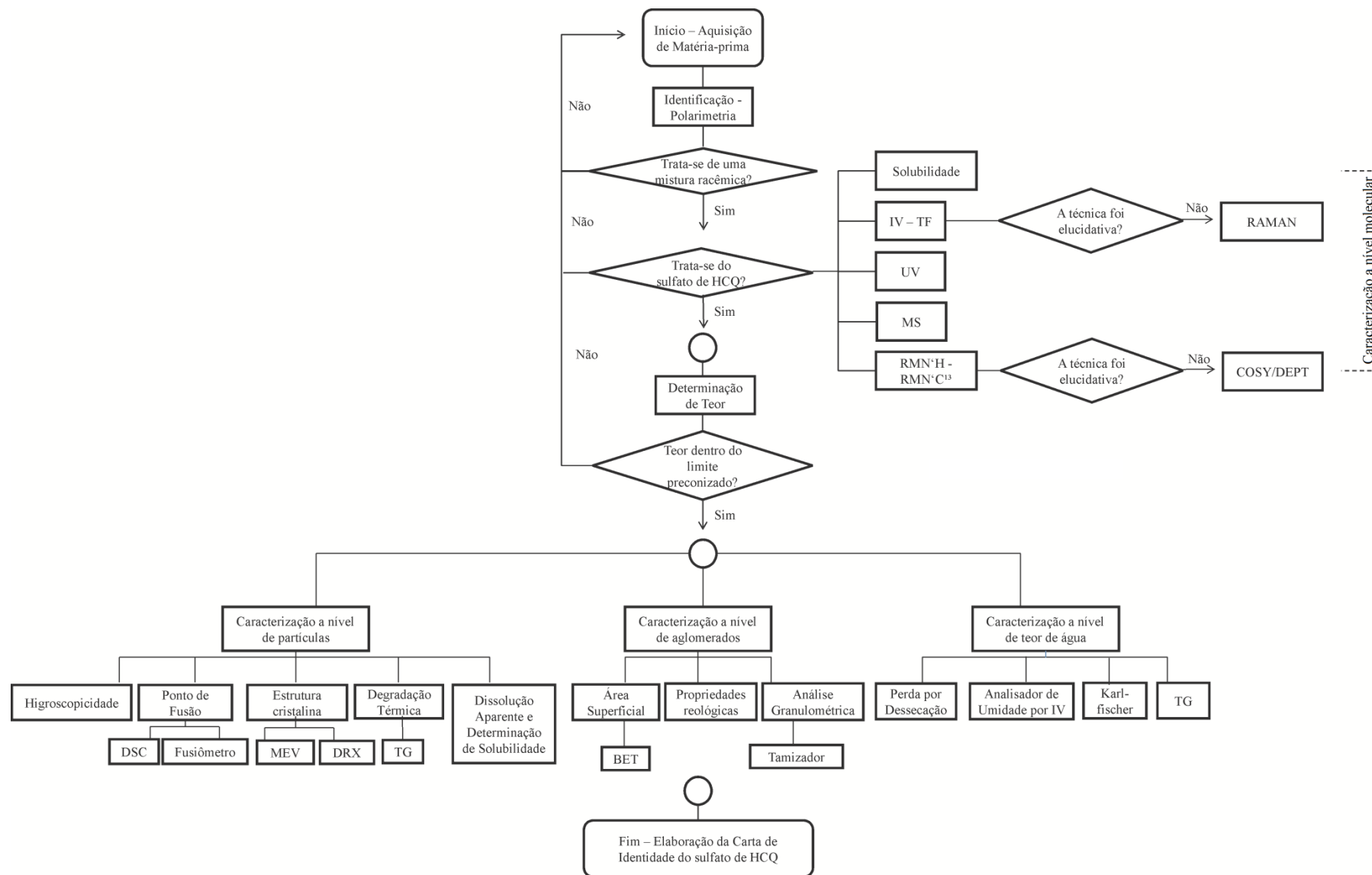
4.1.3.4 Polarimetria

Para determinar a rotação específica (α_D) do sulfato de HCQ foi utilizado o polarímetro Jasco p-200[®], dotado de lâmpada de sódio (589 nm), com auxílio de uma cuba de 100 mm e à temperatura ambiente. O ensaio foi realizado em triplicata de soluções de concentração a 5% (p/v).

4.1.3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN-¹H e ¹³C) e bidimensionais (COSY e DEPT) foram obtidos em espectrômetro Varian[®] Unity Plus 400 MHz para H e 100 MHz para ¹³C, solubilizado água deuterada (D₂O).

Figura 11. Árvore decisória para execução do estudo de pré-formulação do sulfato de hidroxycloquina.



4.1.4 Caracterização a nível de partículas

A seguir estão expostas todas as técnicas de caracterização físico-química que exploram a molécula a nível de partículas.

4.1.4.1 Determinação de higroscopicidade

Para determinar a capacidade de absorção de água pelo sulfato de HCQ frente à umidade relativa (UR) do ambiente em que se encontram, procedeu-se de acordo com técnica descrita por Ferreira e colaboradores (2012).

Amostras de 0,5 g, em triplicata, foram acondicionadas em pesa-filtros e mantidas em recipiente hermético para garantir a saturação de UR constante, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à exposição de diferentes condições de UR: 28, 65 e 95% ($\pm 5\%$), utilizando sílica gel e soluções salinas de ureia e fosfato dicálcico, respectivamente, para a saturação do ambiente. Tais condições foram confirmadas através de um termohigrômetro digital J.Prolab[®] modelo SH 122.

As amostras foram analisadas nos tempos: 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias e a percentagem de água adsorvida (U%) foi calculada em relação ao peso, em gramas, da amostra seca (Ps) e úmida (Pu), através da equação 4.

$$\text{Equação 4. } U\% = \frac{(Pu - Ps)}{Ps} \times 100$$

4.1.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC): determinação de pureza e ponto de fusão

A curvas DSC do sulfato de HCQ e das MB foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu[®] DSC-60 interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, na faixa de temperatura de 25–500°C. As amostras foram colocadas em porta-amostra de alumina hermeticamente fechada com massa de 5 mg ($\pm 0,2$) de fármaco e 10 mg ($\pm 0,2$) das MB. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4.1.4.3 Determinação de ponto de fusão por fusiômetro

Para determinação do ponto de fusão, foi utilizado equipamento QUIMIS[®] – modelo Q-340S23, série: 08051053. Em triplicata, aumentou-se gradativamente a temperatura até observar os processos inicial e final do evento de fusão.

4.1.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A amostra foi preparada sobre dupla fita de carbono contida em suporte (*stub*) de cobre e metalizada sob vácuo com a deposição de uma fina camada de ouro em equipamento BAL-TEC[®] modelo SCD 050. As análises de MEV do sulfato de HCQ foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura da JOEL[®], modelo JSM-5900, utilizando aumentos de 300 e 750 vezes.

4.1.4.5 Difração de raios-X (DRX)

A análise de DRX do sulfato de HCQ foi realizada em difratômetro D5000 da SIEMENS[®], equipado com ânodo de cobre a uma velocidade de varredura de $1,2^{\circ}.\text{min}^{-1}$, na faixa do ângulo 2θ de 5° - 45° .

4.1.4.6 Termogravimetria (TG)

A fim de evidenciar o comportamento térmico das amostras analisadas, as curvas TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de $100 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$, sendo a massa da amostra cerca de 5 mg ($\pm 0,05$) para o sulfato de HCQ isolado, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600°C na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco.

4.1.4.7 Estudo de dissolução intrínseca

O estudo de dissolução intrínseca do fármaco foi realizado através de adaptações à metodologia referente ao teor do fármaco contido na forma farmacêutica sólida, descrita em monografia específica na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013). As alterações consistiram em: uso do método otimizado no presente estudo e utilização de soluções aquosas em diferentes pH's como meio de dissolução. A ideia foi aplicar o conceito *QbD* – observação das variações-respostas – e simular a condição do trato gastrointestinal, por meio de preparação de soluções com pH's: 1,2; 6,6; 7,0; 8,0 ($\pm 0,2$) (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002); afim de mimetizar condições fisiológicas. Foi utilizado equipamento dissolutor Varian[®], modelo VK 7010 e VK 750 e aparato pá, bem como descrito pela Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013). As análises foram procedidas com amostras de 200 mg de sulfato de HCQ, com tamanho de partícula entre 60 e 100 μm . Essa situação satisfaz a condição *sink*, já que, durante todo o ensaio, a concentração do meio permanece em uma faixa de saturação de 10-15%. Nos intervalos de coleta (5, 15, 30, 45 e 60 minutos); alíquotas de 5 mL foram retiradas e filtradas (em papel-filtro com tamanho de poro 45 μm) para determinação do teor dissolvido segundo o método analítico previamente otimizado.

4.1.4.8 Ensaio quantitativo de solubilidade

A solubilidade do fármaco foi avaliada em meios aquosos e em diferentes pHs, baseando-se na mesma premissa descrita no estudo de dissolução aparente (subitem 2.4.7). A quantificação foi realizada por meio de método otimizado no presente estudo, por CLAE-DAD. Amostra de sulfato de HCQ foi continuamente depositada em tubos de ensaio até formação de corpo de fundo persistente e aquecida com o auxílio de um equipamento banho-maria, com agitação e temperatura controladas (60 rpm e 25°C). Ao final da análise, a mistura foi filtrada em papel-filtro com tamanho de poro 45 μm e, a solução saturada, submetida à determinação de teor.

4.1.5 Caracterização a nível de aglomerados de partículas

A seguir estão expostas todas as técnicas de caracterização físico-química que exploram a molécula a nível de aglomerado de partículas.

4.1.5.1 Descrição, tamanho de partícula e análise morfológica

A matéria-prima foi visualizada a olho nu, para verificação do aspecto e cor. Para a determinação da distribuição do tamanho das partículas foi utilizado equipamento Tamizador Bertel[®]. O ensaio foi realizado em triplicata e seguiu metodologia descrita pelos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5^a Edição. Foram utilizados tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poro (44, 90, 150, 250, 500 e 600 μm) (BRASIL, 2010).

4.1.5.2 Área superficial e tamanho de poros

A área superficial específica foi obtida através de adsorção física de nitrogênio sobre o pó da matéria-prima, pelo método Brunauer-Emmett-teller (BET). Utilizou-se analisador de área superficial ASAP 2440 Micrometrics[®], munido de software S_{BET} . Foram pesados aproximadamente 100 mg de sulfato de HCQ, submetidas a degaseificação por 48 horas a 110°C. A análise se deu com temperatura de atomização 1660°C no fluxo de ar 350 mL/hora.

4.1.5.3 Propriedades de fluxo

A densidade foi determinada através de ensaio com 10 g da amostra em compactador automático (Tap Density, Varian[®]) provido de proveta normatizada, em triplicata. O volume inicial ocupado pelo produto foi medido, e posteriormente foram realizadas 10 compactações para acomodação do pó. Em seguida, foram realizadas 1250 compactações. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades aparente (d_{AP}) e de compactação (d_{CP}). A compressibilidade do pó foi avaliada através do Índice de Hausner (IH) e o Índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes

equações: $IH = d_{CP}/d_{AP}$ e $IC (\%) = (d_{CP}-d_{AP})/d_{CP} \times 100$, respectivamente (ALVES et al., 2008).

O ângulo de repouso foi medido pelo cone de pó formado através do escoamento da matéria-prima através de um funil de dimensões padronizadas sobre uma superfície plana munida de papel milimetrado. O ângulo formado entre o cone e a superfície foi mensurado através do cálculo da tangente. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo necessário para o escoamento de uma quantidade pré-definida de fármaco através do funil, utilizando-se um cronômetro digital (ALVES et al., 2008; MARSHALL, 2001).

A determinação da distribuição do tamanho das partículas foi verificada utilizando tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poros (44, 90, 150, 250, 500 e 600 μm), montados em uma base com vibração magnética (Tamizador Bertel®). amostra de sulfato de HCQ (25 g) foi colocada no tamis superior e o conjunto foi submetido à tamisação por 15 min, em triplicata (BRASIL, 2010).

4.1.6 Caracterização a nível de teor de água

A seguir estão expostas todas as técnicas de caracterização físico-química que exploram a molécula no que tange o teor de água.

4.1.6.1 Perda por dessecação

A perda por dessecação foi realizada conforme metodologia descrita na monografia específica na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013). Ao fim da análise – realizada em triplicata – determinou-se a porcentagem de perda por dessecação através da Equação 5, onde: P_u é peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; P_s , o peso do pesa-filtro contendo a amostra após da dessecação e P_a , o peso da amostra.

$$\text{Equação 5. } \% = \frac{(P_u - P_s)}{P_a} \times 100$$

4.1.6.2 Analisador de umidade eletrônico (termogravimetria)

Para analisar a umidade residual da matéria-prima foi utilizado Analisador de umidade eletrônico Sartorius® (modelo MA35). Amostras de 0,5 g foram depositadas na balança do equipamento e submetidas ao aquecimento até que o peso se observasse constante. A análise foi realizada em triplicata.

4.1.6.3 Determinação de água por Karl-Fischer (método volumétrico)

Para determinação de água pelo método volumétrico, foi utilizado o seguinte equipamento: Karl Fisher Fab. QUIMIS® /Mod.349.2. As análises foram realizadas em triplicata, conforme metodologia descrita por Vieira e colaboradores (2013).

4.1.7 Desenvolvimento e otimização de método analítico para doseamento do fármaco

O método analítico para quantificação do sulfato de HCQ foi desenvolvido a partir de adaptações à metodologia descrita em monografia específica na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013) referente à quantificação do fármaco. A otimização foi proposta visto que o método farmacopeico não se demonstrou reprodutivo, apresentando cromatograma com pico bastante assimétrico. Sugere-se que o valor indesejável do fator de cauda (diferente de 1) se deva à coeluição dos isômeros da HCQ presentes na mistura racêmica. Além disso, o tempo de retenção de mais de 1 hora inviabiliza a utilização do método na prática laboratorial. Para a otimização do método analítico, foi proposto um planejamento fatorial 3^3 , baseado nos conceitos do *QbD*. O *Design Space* foi criado tendo o fator de cauda como resposta da qualidade, evidenciando a condição analítica ideal o valor compreendido entre 0,98 e 1,2. Com isso, foi possível avaliar o impacto dos fatores e a interação entre eles. Para tal, foram efetuadas mudanças na concentração da composição da fase-móvel (90:10; 80:20 e 70:30 de Fase Móvel USP:Metanol), fluxo (0,8; 1,0 e 1,2 mL) e temperatura do forno (30; 35 e 40°C). Em seguida, o método foi co-validado a partir da obtenção dos resultados dos parâmetros: linearidade, repetitividade, precisão intermediária e exatidão.

Vale salientar que a Fase Móvel USP é constituída de: água:metanol:acetonitrila (8:1:1), adicionada de ácido fosfórico e de 1-pentanosulfonato de sódio.

4.2 QUALITY BY DESIGN NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA DOSEAMENTO DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA

Os material e métodos utilizados para o desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento do sulfato de hidroxycoloroquina estão dispostos a seguir.

4.2.1 Matéria-prima, reagentes e equipamentos

Para as etapas correspondentes ao desenvolvimento do método e sua validação, foram utilizadas como matéria-prima a HCQ adquirida através da FAGRON[®] do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX#7 e sintetizado pela indústria Sanofi-Aventis[®], enquanto o padrão analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich[®], lote # 022M4749V (Pureza declarada de 99,78% por CLAE-DAD). Para avaliar a influência exercida por uma mistura de excipientes sobre o sulfato de HCQ, foi utilizado o medicamento Plaquinol[®] (Sanofi-Aventis[®]). O comprimido foi pulverizado em almofariz e pistilo e o pó foi utilizado para a realização das análises.

Os reagentes, todos de grau analítico, foram os seguintes: ácido clorídrico 0,1M (Dinâmica[®]), água destilada (pH 7,0 ± 5), hidróxido de sódio 0,1 M (Vetec[®]), peróxido de hidrogênio 3% (Dinâmica[®]), fosfato de cálcio dibásico (Vetec[®]), talco farmacêutico (Talmag Manesita[®]) e amido (Corn Products[®]). Foram utilizados: Espectrofotômetro UV-Vis Cary 300 Conc Varian[®], cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico Varian[®] e Espectrofotômetro Varian[®] Vankel-Cary 50 e Câmara de Fotoestabilidade Nova Ética[®] (modelo C242), que consiste na associação de lâmpadas UV e fluorescente com emissão de 30.000 lux e 13,33 w/m² por hora. Em todos os parâmetros foram utilizadas balanças analíticas de alta precisão (Bioprecisa[®]) e vidrarias calibradas.

4.2.2 Desenvolvimento do método por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis

Toda a concepção do método método por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis para doseamento do sulfato de hidroxycoloroquina está descrita a seguir.

4.2.2.1 Princípio do método

Por não haver monografia específica em compêndios oficiais brasileiros, o método baseou-se no teste de identificação do fármaco por absorção ultravioleta preconizado pela *United States Pharmacopeia* (USP) (USP, 2010, pág. 2592-3). Assim, foram utilizados como parâmetros iniciais a concentração de leitura da amostra e solução diluente especificado: $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e HCl 0,01M, respectivamente.

Para a preparação da amostra, foi utilizada a metodologia descrita pela Farmacopeia Americana (USP 36) para o método de doseamento do sulfato de HCQ na forma farmacêutica, por CLAE-DAD. Para alcançar a concentração de leitura ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) deviam ser realizadas duas sucessivas diluições, o que pode ser a origem de erros aleatórios. Para a análise da absorbância foram realizadas varreduras espectrofotométricas na faixa de 200 a 700 cm^{-1} , em triplicata, das soluções amostras.

O preparo da amostra demonstrou-se como o primeiro ponto crítico para garantia de seguridade analítica: a realização de 2 diluições requer um maior tempo de execução do experimento e pode acarretar em maior número de erros analíticos. No intuito de contornar esse problema, foi realizada uma comparação estatística (através de teste *t-Student*) entre as duas sucessivas diluições (1:20 seguido de 1:5) e apenas uma diluição direta (1:100) para alcançar a concentração de leitura ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O restante do processo de otimização foi proposto para avaliar a real necessidade da agitação através de banho ultrassônico e do uso de HCl 0,01M como solução diluente, condições essas preconizadas pela monografia específica do fármaco na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013).

A partir do teste de identificação da Farmacopeia Americana foi realizada uma análise comparativa do doseamento nas seguintes condições: com (durante 15 min) e sem agitação em banho ultrassônico com o intuito de diminuir o tempo experimental do método analítico e reduzir custos operacionais devido ao uso do equipamento. Em seguida, foi testada a variação da solução diluente utilizada (HCl 0,01 M e água destilada) visto que a utilização de água possibilitaria economia de tempo, de reagentes utilizados e a não produção de resíduos analíticos.

Para realizar o menor número de experimentos possível e de maneira simples e organizada foram aplicados conceitos de *QbD* e *DoE*. Com isso, foi proposto um planejamento fatorial 2^2 visando avaliar a influência de uma determinada variável sobre a precisão do método. O método apresenta dois fatores principais (agitação e solução diluente)

e, conseqüentemente, a esses são aplicados dois níveis (com e sem agitação e utilização de água e HCl como solução diluente, respectivamente). A organização do planejamento fatorial está demonstrada na tabela 5.

Tabela 5. Organização do planejamento fatorial 2²

Fatores	Níveis	
	+	-
Solução diluente	Água destilada	HCl 0,01M
Sonicação	15 minutos	Ausência de Agitação

A fim de avaliar a influência das variáveis no experimento, bem como a interação entre elas, foi selecionada a utilização do gráfico de Pareto como ferramenta. Todos os resultados foram expressos no intervalo de confiança de 95%.

4.2.2.2 Preparo da solução-amostra

As amostras de sulfato de HCQ matéria-prima foram analiticamente pesadas e solubilizadas em HCl 0,01M, obtendo-se uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (solução estoque). A esta segue uma primeira diluição (1:20), e uma segunda (1:5); visando obter a concentração final de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata.

4.2.2.3 Preparo da curva de calibração

De forma semelhante ao procedimento realizado para preparo da solução amostra, o padrão analítico foi utilizado para obter a solução estoque de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e realizar diluições com HCl 0,01M a fim de obter as seguintes concentrações: 8, 9, 10, 11 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva controle foi preparada a cada dia de análise e utilizada para o cálculo das concentrações.

4.2.4 Validação do método analítico desenvolvido

Uma vez desenvolvido o método analítico de quantificação do sulfato de HCQ, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, robustez, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Tais parâmetros foram avaliados de acordo com as normas estabelecidas pelo ICH Q2A e Q2B e pela RE nº 899 de 2003 (ANVISA), uma vez que este trabalho encontra-se classificado como método analítico para determinação quantitativa. O nível de confiança dos resultados obtidos foi observado pelos seguintes tratamentos: coeficiente de variação (CV%) inferior a 5% e análises estatísticas através de teste t-Student, ANOVA One-Way e Two-Way, quando aplicável.

4.2.4.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade e/ou especificidade de um método garante que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação, fármacos coadministrados ou adjuvantes utilizados nas formulações (CASSIANO et al., 2009).

Para avaliar a seletividade, foi realizado um estudo preliminar de degradação forçada do fármaco. Para isso, as amostras foram submetidas às seguintes condições de estresse: hidrólise ácida, básica (HCl 1M e NaOH 1M, respectivamente), oxidação (peróxido de hidrogênio 5%) – na proporção 3:1 solução degradativa:amostra – e fotólise ($45 \pm 5^\circ\text{C}$ / 15 min). As soluções foram mantidas em temperatura ambiente e analisadas após 72 horas, pelo método desenvolvido e comparadas a análise realizada por CLAE-DAD de acordo com a monografia da Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013).

A especificidade do método foi avaliada quanto à contaminação da amostra com excipientes componentes do medicamento referência na forma farmacêutica sólida (comprimido) Plaquinol[®], sendo eles: amido, talco e fosfato de cálcio dibásico. Todas as misturas físicas foram preparadas na proporção 2:1 fármaco:excipiente e as amostras foram pesadas em relação à concentração de sulfato de HCQ.

4.2.4.2 Robustez

Para avaliar o comportamento do método frente a pequenas e deliberadas modificações, os seguintes parâmetros foram alternados e aplicados ao preparo da amostra e/ou método analítico: influência da luminosidade durante o preparo da amostra por meio da presença e ausência de luz branca fria (por não mais que 25 minutos); estabilidade da amostra nos tempos 0, 2 e 4 horas e comprimento de onda de leitura: 341, 342 e 343 nm, mimetizando a possível falta de calibração do equipamento (CASSIANO et al., 2009).

4.2.4.3 Linearidade

A fim de analisar a capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra foi realizada a regressão linear de três curvas autênticas, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios, em cinco concentrações diferentes: 8, 9, 10, 11 e 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A variação média do estudo foi realizada com intervalo de 80 a 120% da concentração média de sulfato de HCQ.

4.2.4.4. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com determinado limite de confiabilidade. Corresponde à concentração que produz um sinal três vezes maior que o nível de ruído médio medido com o branco ou solução controle. O LD foi calculado através da razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração dos ensaios de linearidade e a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicado por 3. Esse mesmo princípio foi utilizado para o cálculo do LQ. Entretanto, foi considerada a razão de 10 vezes a linha de base (LEITE, 1989; SWARTZ & KRULL, 1998; GREEN, 1996; ICH, 1995^b). As duas equações utilizadas estão expostas a seguir (BRASIL, 2003).

$$\text{Equação 6: Limite de Detecção} = \frac{3\text{DP}}{a}$$

$$\text{Equação 7: Limite de Quantificação} = \frac{10DP}{a}$$

4.2.4.5 Precisão

Tal parâmetro corresponde aos critérios de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste trabalho, os três níveis foram avaliados. A repetitividade (precisão intra-ensaio) corresponde à proximidade estatística entre os resultados de um mesmo grupo de amostras entre si foi realizada por meio do mesmo analista e mesmo equipamento. A precisão intermediária (precisão inter-ensaio) corresponde à concordância dos resultados obtidos no mesmo laboratório, porém em dias diferentes e realizados por diferentes analistas. Já a reprodutibilidade avalia a concordância de resultados obtidos em diferentes laboratórios e, portanto, por diferentes analistas. A repetitividade foi verificada por seis determinações autênticas a 100% da concentração do teste. O mesmo foi utilizado para a precisão intermediária, porém essa foi realizada em diferentes dias por analistas diferentes. A reprodutibilidade foi avaliada em dois laboratórios diferentes: o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) e o Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) ambos da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil, 2003; ICH, 1995^a; ICH, 1995^b).

4.2.4.6 Exatidão

A semelhança estatística dos resultados obtidos em comparação a valores teóricos padrão foi analisada a partir de amostras de sulfato de HCQ, matéria-prima e padrão analítico, nas concentrações de 50, 100 e 150% da contração de leitura ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em triplicata.

4.2.4.7 Aplicação do método

A metodologia validada foi testada em um lote de sulfato de hidroxicloroquina matéria-prima (FAGRON[®] do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX #7) e em uma marca de comprimidos industrializados: o medicamento de referência (Plaquenol[®], Sanofi-Aventis Lote 04618), reconhecido pela ANVISA (2013). Os resultados foram comparados, de maneira semelhante, por meio do ensaio de doseamento através de espectrofotometria UV

para a matéria-prima e da análise dos comprimidos também, ambos descritos na Farmacopeia Americana USP 36 (USP 36 – NF 31, 2013), e constitui-se em uma variação do método para análise da matéria prima. A fim de avaliar se havia diferença entre as médias dos teores obtidos foi realizado tratamento estatístico teste *t-Student*.

4.3 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

Os material e métodos utilizados para a realização do estudo de compatibilidade do fármaco sulfato de hidroxiclороquina com excipientes farmacêuticos estão dispostos a seguir.

4.3.1 Material

O sulfato de HCQ foi adquirido da FAGRON[®], sintetizado pela indústria Chongqing[®], lote SQK-120502#7 (pureza de 99,18%) Para o preparo das MB, foram utilizados os seguintes excipientes: celulose microcristalina, talco, polivinilpirrolidona (PVP) K-30, croscarmellose sódica, Starch[®] (amido pré-gelatinizado), estearato de magnésio, polietilenoglicol (PEG) 4000, glicolato de amido sódico (GAS), lactose anidra (LA), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Polyox[®].

As MB 1:1 (p/p) do sulfato de HCQ com os excipientes foram preparadas utilizando almofariz e pistilo, triturando a mistura durante 3 minutos cada. As amostras foram armazenadas em frascos0ampola.

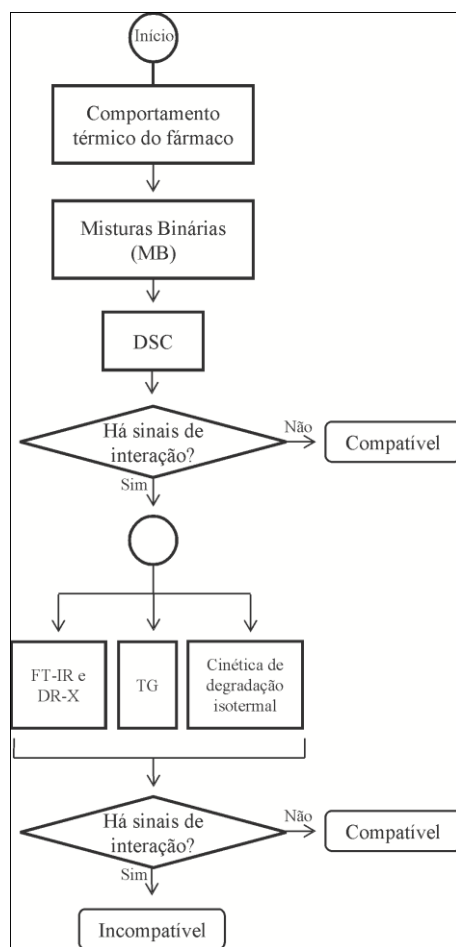
4.3.2 Método de investigação da compatibilidade fármaco:excipientes

O fluxograma apresentado na Figura 12 apresenta o protocolo utilizado para a realização do estudo de compatibilidade. À priori, foram realizadas análises da curva DSC do sulfato de HCQ isolado e desta em MB. Os valores referentes à temperatura inicial de fusão (T_i) foram adotados como indicadores de interação fármaco-excipiente. Posteriormente, após a triagem e seleção das misturas, foram utilizadas técnicas complementares para auxiliar na interpretação dos resultados, dentre elas: TG, IV-TF, DR-X e avaliação da cinética de decomposição isotérmica do sulfato de HCQ isolado e em MB.

4.3.3 DSC, TG/DTG, IV-TF e DR-X

Todas as análises foram realizadas conforme metodologias descritas na PARTE EXPERIMENTAL I.

Figura 12. Fluxograma para execução do estudo de compatibilidade.



4.3.4 Estudo da cinética de degradação térmica do sulfato de HCQ e das MB

O estudo da cinética de degradação térmica visa a definição do prazo de validade estimado de um material em sua forma sólida.

Para a análise da cinética de degradação e seus parâmetros através do método não-isotérmico, o método de Ozawa foi aplicado nas MB selecionadas, utilizando o *software* apropriado instalado no equipamento TA60 Shimadzu®. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições e equipamento utilizados na metodologia descrita na PARTE

EXPERIMENTAL I; nas razões de aquecimento: 2,5; 5; 10; 20 e 40°C min⁻¹ (SANTOS et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005; CIDES et al., 2006; SALVIO-NETO & MATOS, 2011).

Os mesmos *software* e equipamento foram utilizados para a determinação da cinética de decomposição e seus parâmetros através de método isotérmico, a equação de Arrhenius foi aplicada nas amostras do fármaco isolado e das MB selecionadas. Foram obtidas curvas por meio do aquecimento das amostras até temperaturas de isoterma antecedentes ao principal evento de degradação do fármaco isolado, definidas através do método das tangentes e mantidas em atmosfera de nitrogênio (100 mL.min⁻¹) durante o tempo necessário para uma perda de massa de 10 ± 0,5%

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA EXERCIDA POR UMA MISTURA DE EXCIPIENTES SOBRE O SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA EM UMA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO ATRAVÉS DE ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

Os material e métodos utilizados para avaliar a influência dos excipientes do Plaquinol[®] sobre o sulfato de hidroxiclороquina estão dispostos a seguir.

4.4.1 Material

O sulfato de HCQ foi adquirido da FAGRON[®], sintetizado pela indústria Chongqing[®], lote SQK-120502#7 (pureza de 99,18%).

Para avaliar a influência exercida por uma mistura de excipientes sobre o sulfato de HCQ, foi utilizado o medicamento Plaquinol[®] (Sanofi-Aventis[®]) como forma farmacêutica de referência. O comprimido revestido de 400 mg (o equivalente a 310 mg de HCQ base livre) contém: fosfato de cálcio dibásico di-hidratado, lactose, amido de milho, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio. O comprimido foi pulverizado em almofariz e pistilo e o pó foi utilizado para a realização das análises em relação estequiométrica do fármaco.

4.4.2 DSC, TG/DTG

Todas as análises foram realizadas conforme metodologia adaptada descrita na PARTE EXPERIMENTAL I. Tal adaptação corresponde a massa da amostra, calculada com base na proporção de fármaco contida no pó do comprimido ($7,28 \pm 0,2$ mg).

4.4.3 DSC-fotovisual

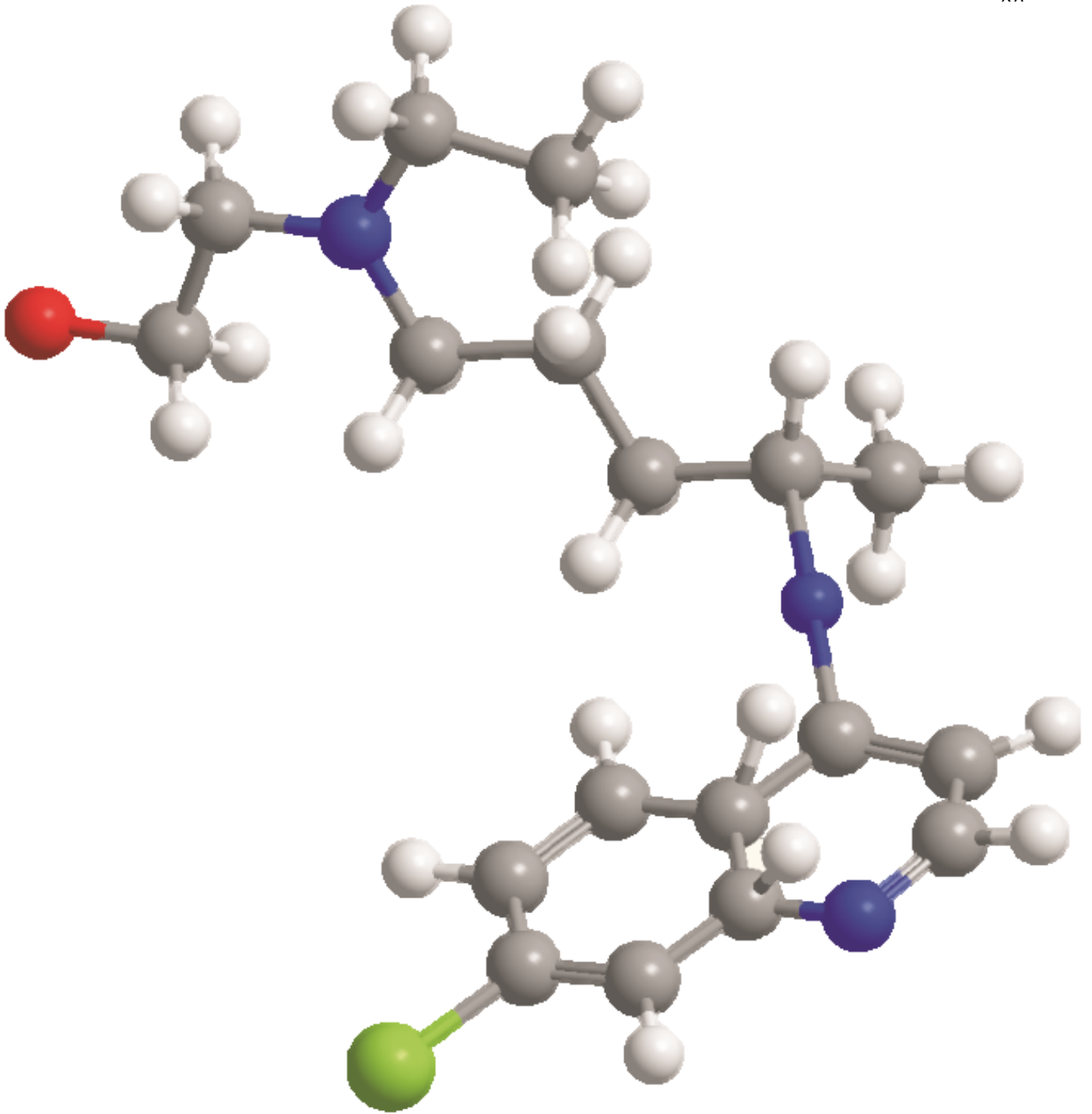
Os estudos de DSC-fotovisual foram realizados com calorímetro modelo DSC-50 Shimadzu[®], em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 100 mL.min^{-1} , a uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, até 500°C . O DSC foi acoplado a um sistema fotovisual envolvendo um Microscópio Olympus[®] ligado a uma Câmera Sanyo modelo VCC-D520. As amostras (2,00 mg) foram colocadas em suporte de amostras em alumínio. Em seguida, a célula foi selada hermeticamente. A temperatura e razão de aquecimento do equipamento DSC foram calibrados pela fusão ponto e entalpia dos padrões de índio e zinco (MACÊDO E NASCIMENTO, 2001; SILVA et al., 2009).

4.4.4 Pirólise-CG/MS

Os estudos de pirólise foram conduzidos no pirolisador acoplado a um cromatógrafo gasoso (Shimadzu[®], GCMS - QP5050A) diretamente ligado a um espectrômetro de massa usando elétrons como fonte de ionização. A fragmentação foi realizada pelo impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro foi operado no modo de varredura, varrendo uma faixa massa de 50-600 m/z. A temperatura da fonte iônica foi de 300°C . A coluna capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 mm tamanho de partícula foi utilizado como fase estacionária fenil:dimetilpolisiloxano (5:95). O programa de temperatura da coluna foi o aumento da temperatura segmento, com uma taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ até a temperatura final de 280°C . Hélio foi utilizado como gás de arraste um fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ com razão de divisão de 1:5. A amostra do sulfato de HCQ no estado sólido foi posto em cadinho de platina no pirolisador à temperatura de 300°C durante cada experimento.

4.4.5 Estudo da cinética de degradação térmica das MB

O prazo de validade do sulfato de HCQ na forma farmacêutica sólida comprimido foi estimado através do estudo cinético de degradação isotérmico e não-isotérmico conforme metodologia descrita na PARTE EXPERIMENTAL III, item 4.3.4.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi feita uma criteriosa discussão sobre a consequência dos achados. Os resultados e a discussão estão descritos a seguir.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE APLICAÇÃO DE *QUALITY BY DESIGN* NOS ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

A seguir, estão descritos os resultados obtidos e a respectiva discussão no que tange à caracterização físico-química do sulfato de hidroxiclороquina.

5.1.1 Caracterização a nível molecular: Identificação química

A identidade do sulfato de HCQ pôde ser comprovada através da corroboração dos resultados obtidos das diversas metodologias aplicadas. Para isso, foram utilizadas: espectrofotometria de absorção na região do IV e do UV e EM-MALDI-TOF, além da análise de polarimetria.

Bastante utilizado como ferramenta no controle de qualidade de medicamentos, os espectrofotômetros de IV e Raman oferecem procedimento simples e rápido capaz de identificar pequenas diferenças estruturais entre as moléculas, exceto quando estas estão envolvidas com isomeria óptica. Assim, por se tratar de um sal de mistura racêmica, a molécula de sulfato de HCQ pode apresentar distinções nas bandas características do seu espectro.

A seleção do melhor método depende do princípio da técnica. A absorção no IV corresponde à variação do momento de dipolo da molécula, enquanto o espalhamento Raman, à variação da polarizabilidade. Dessa forma, os espectros de Raman e IV são complementares, embora haja casos de baixa simetria molecular existam bandas nas mesmas posições, variando somente a intensidade. Geralmente, vibrações simétricas e grupos não-polares fornecem as bandas de espalhamento de Raman mais intensas, enquanto vibrações assimétricas e grupos polares fornecem bandas de absorção mais intensas no IV (STEPHENSON et al., 2001; SPONG et al., 2004;).

O espectro de absorção na região do IV do sulfato de HCQ (Figura 13.a) apresenta picos característicos dos seus principais grupos funcionais. Foi possível observar: a deformação axial do álcool (–OH) e deformações N-H, típicas de amins secundárias e terciárias; as bandas referentes aos estiramentos das ligações C–H estão na região compreendida entre 3100 e 2500 cm^{-1} , estando sobrepostas por uma banda alargada referente a interações intermoleculares entre as ligações de hidrogênio; as bandas específicas relacionadas às deformações simétrica e assimétrica (S=O, oriundas do sulfato); além do pico característico do halogênio ligado ao átomo de carbono (C-Cl). Não foi possível distinguir e especificar as bandas específicas de hidrogênios aromáticos e da deformação axial da ligação C-N, devido à intensa sobreposição de picos (região entre 950 – 1150 cm^{-1}). A tabela 6 mostra as principais bandas relacionadas aos respectivos tipos de vibração da ligação, região esperada e grupos funcionais. A enumeração correlaciona os valores das bandas e suas respectivas posições no espectro.

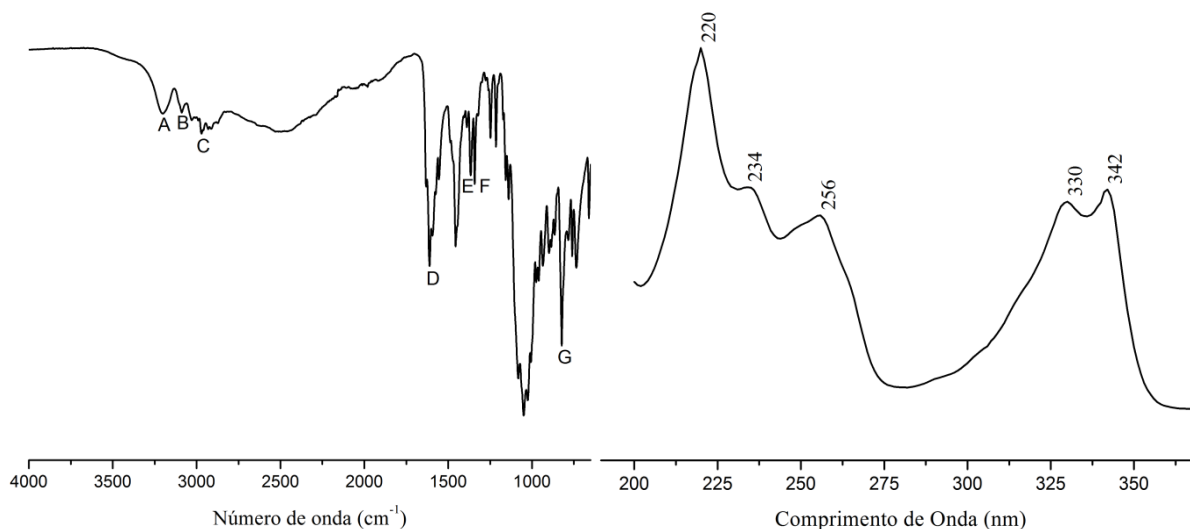
Tabela 6. Correlação entre as bandas, tipos de vibração da ligação e seus respectivos grupos funcionais, obtido do espectrograma de infravermelho do sulfato de hidroxicloroquina.

Banda (cm^{-1})	Tipo de Vibração da Ligação	Região Esperada	Grupo Funcional
A – 3202	Deformação axial –OH	3584 – 3650 cm^{-1}	Álcool
B – 3028	Deformação axial N-H de heteroátomo	3310 – 3350 cm^{-1}	Anel heterocíclico
C – 2970	Deformação axial C-H de compostos aromáticos	2950 – 3100 cm^{-1}	Esqueleto aromático
D – 1611	Deformação axial do anel (bandas do esqueleto) C=C e C=N	1580 – 1670 cm^{-1}	Compostos aromáticos e alcenos
E – 1365	Deformação axial assimétrica S=O	1177 – 1386 cm^{-1}	Sulfato
F – 1342	Deformação axial simétrica S=O	1177 – 1386 cm^{-1}	Sulfato
G – 822	Deformação axial C-Cl alifática	550 – 850 cm^{-1}	Cloro

A varredura espectrofotométrica do sulfato de HCQ (Figura 13.b) mostrou 5 máximos de absorção nos seguintes comprimentos de onda: 220, 234, 256, 330 e 342 nm. Tais valores correspondem à presença de grupos cromóforos presentes na molécula. Esta última e maior

delas é atribuída ao grupo quinolínico (USP 36 – NF 31, 2013; ARGUELHO, ANDRADE & STRADIOTTO, 2002).

Figura 13. (a) Espectro de absorção na região do infravermelho e (b) Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxicloroquina



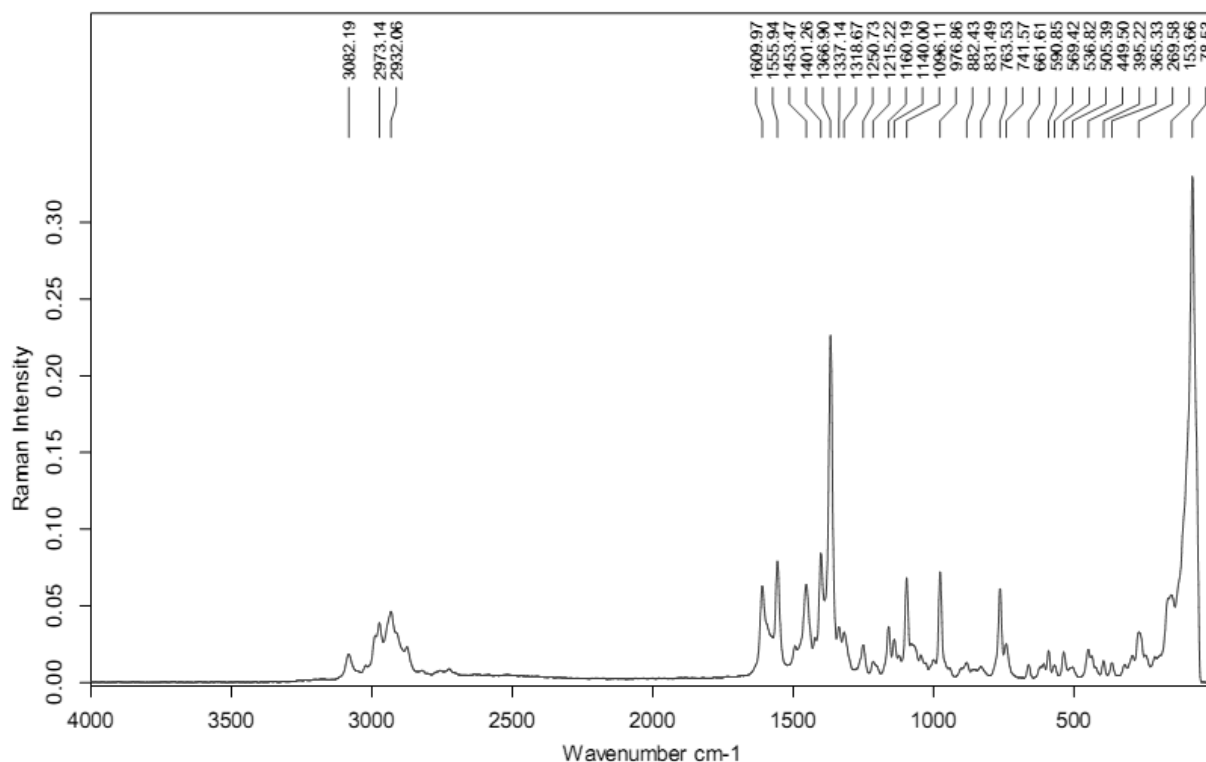
A interação da molécula de HCQ com o ânion sulfato e com as ligações de hidrogênio intermoleculares foi observada na região entre 2250 – 2750 cm⁻¹. O deslocamento e somação das bandas de amina e hidroxila sugerem que as ligações supracitadas ocorrem nesses grupos funcionais ou, pelo menos, próximos a eles (ROLIM, 2012).

O espectro de Raman (Figura 14) foi utilizado a fim de corroborar a afirmação supracitada. De fato, a alteração nas bandas de amina e hidroxila foi evidenciada, uma vez que, no espectro Raman, não houve aparecimento de bandas na região compreendida entre 2250 – 2750 cm⁻¹.

Os espectros de RMN de ¹³C e ¹H do sulfato de HCQ possibilitaram a elucidação da sua estrutura química. A partir desses resultados, foi verificada a presença de 19 átomos de carbono com base no espectro de RMN ¹³C (tabela 7). É notório que tal estrutura apresenta dois anéis aromáticos, pois existem nove carbonos que apresentavam deslocamentos químicos característicos dessas estruturas. Com destaque para o deslocamento químico dos carbonos 10, 7, 4 e 2 (acima de 137 ppm) desblindados por estarem ligados diretamente a átomos de maior eletronegatividade.

Os resultados obtidos por RMN ¹³C foram confirmados por RMN ¹H (tabela 7), já que, foram observados cinco deslocamentos químicos entre 7 e 8 ppm, relativos aos deslocamentos de hidrogênios aromáticos, geralmente nesta faixa (CARAMORI & OLIVEIRA, 2009).

Figura 14. Espectro de Raman do sulfato de HCQ.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H para o sulfato de HCQ dissolvido em água deuterada (D_2O)

Tipos de ^{13}C	Deslocamento químico (ppm)	Tipos de ^1H	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade dos sinais
C19	7.857	Aromáticos		
C12	18.577	H2	8	Dubleto
C14	20.056	H5	7.7	Dubleto
C13	31.713	H8	7.18	Dubleto
C15	48.248	H6	7.05	Duplo dubleto
C11	49.495	H3	6.57	Dubleto
C18	52.051	H2	8	Dubleto
C16	53.670	Alifáticos		
C17	55.289	11	3.85	Multipleteo
C3	98.546	17	3.72	Multipleteo
C9	114.392	15-16-18	3.18	Multipleteo
C6	118.343	13-14	1.7	Multipleteo
C8	123.811	12	1.21	Dubleto

C5	126.769	19	1.17	Tripleto
C7	137.310			
C4	138.635			
C2	142.043			
C10	154.59			

A análise dos resultados obtidos através dos RMN's encontra-se em consonância com aqueles observados por Dongre e colaboradores (2009).

O EM da HCQ (Figura 15) evidencia a ionização positiva da base livre por ser composta por três grupamentos amina facilmente protonados, evidenciando um sinal com 100% de intensidade característico $[M + 1]^+ = 336,18 \text{ m/z}$, já que a massa molecular do HCQ é 335,17 g/mol. A fonte de ionização utilizada foi o MALDI na frequência de 100 Hz, ocorrendo um fragmentação do íon parente na fonte, podendo ser observado o perfil de fragmentação pelos sinais em $318,17 \text{ m/z} = [M - 16]^+$, $302,22 \text{ m/z} = [M - 32]^+$, $292,16 \text{ m/z} = [M - 42]^+$, $247,10 \text{ m/z} = [M - 87]^+$ relativos a fragmentação da HCQ base livre, corroborando com a estrutura química da HCQ, já que demonstrou a ionização de seus grupamentos polares mais externos, bem como, dos ligantes das aminas secundárias.

A interpretação do conjunto de dados obtidos até então conduziu à elucidação da molécula de HCQ base livre (figura 15).

A partir do EM mencionado acima, decidiu-se conhecer os possíveis produtos de degradação através de múltipla ionização do pico majoritário. A técnica proporcionou a elucidação de alguns dos principais fragmentos da molécula do HCQ base livre (Tabela 8).

Figura 15. Espectro de massa da HCQ e estrutura química da hidroxicloroquina base livre com enumeração de carbonos.

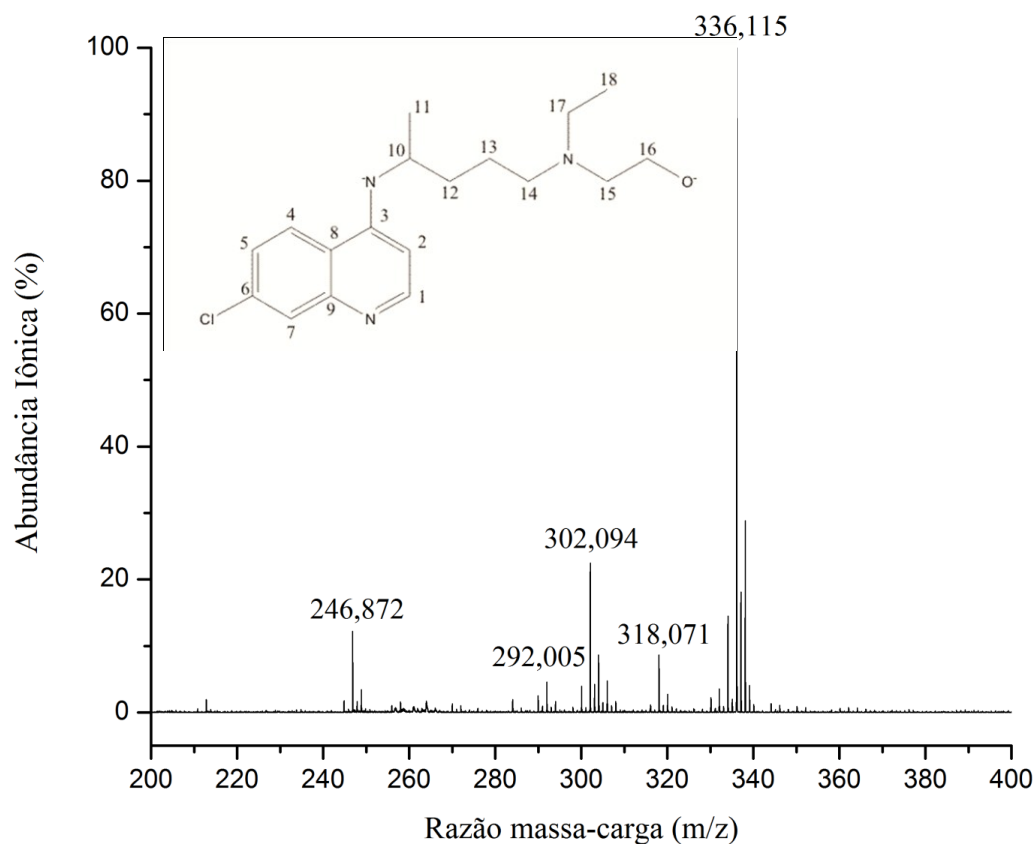


Tabela 8. Fragmentos da hidroxicloroquina base livre obtidos através de múltipla ionização do pico majoritário.

Fórmula Estrutural	Massa Molecular	Estrutura
$C_{18}H_{28}N_3O^+$	302,22	
$C_{16}H_{23}ClN_3^+$	292,16	

$C_{14}H_{16}ClN_2^+$	247,10	
$C_{18}H_{25}ClN_3^+$	318,17	

Os resultados da análise de polarimetria confirmaram a natureza da mistura racêmica do material. O resultado para a rotação específica ($\alpha_D=0,03$) evidencia que não há desvio algum da luz polarizada, comprovando a proporção equimolar dos isômeros da HCQ (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

Em relação à identificação da molécula quanto a sua solubilidade em determinados solventes, foi observado através do ensaio de solubilidade semi-quantitativo que o sulfato de HCQ apresenta problemas de solubilidade em solventes orgânicos. Em contrapartida, é facilmente solúvel em água e em soluções aquosas com pH entre 2,0 e 8,0; como visto na Tabela 9.

Tabela 9. Solubilidade do sulfato de hidroxiclороquina em diferentes solventes e pH's.

Solventes	Volume Utilizado	Solubilidade
Água	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Solução pH 2	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Solução pH 6,6	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Solução pH 7,0	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Solução pH 7,6	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Solução pH 8,0	< 1 mL	Facilmente Solúvel
Alcool Metílico (metanol)	<1000 mL	Pouco Solúvel
Álcool Etílico (etanol)	< 1000 mL	Pouco Solúvel
Álcool Isopropílico	< 1000 mL	Pouco Solúvel
Acetona	< 1000 mL	Pouco Solúvel

Observada a sua alta solubilidade em água, deve-se analisar condições e pontos críticos durante a produção de formas farmacêuticas contendo HCQ para que o fármaco mantenha-se íntegro e estável em locais de elevada umidade.

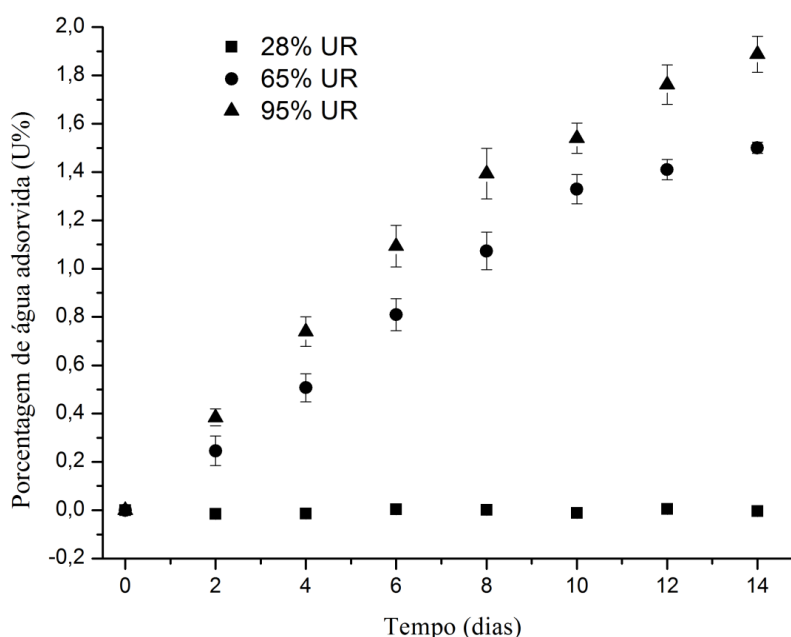
5.1.2 Caracterização a nível de partículas

A umidade é um fator que influencia a estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos. Ela assume papel significativo nas características reológicas do produto, essenciais no desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida. A umidade de materiais destinados à compressão ou enchimento de invólucros e em concentrações inferiores a 1% pode afetar o comportamento destes e/ou do produto final (MARSHALL, 2001; CHAVES, COSTA & FREITAS, 2009).

O comportamento higroscópico do sulfato de HCQ foi evidenciado em relação à porcentagem de água adsorvida na amostra do fármaco. A figura 16 traz a representação gráfica dessa capacidade de sorção/dessorção de água durante o estudo.

Foi verificado que a adsorção de água pelas amostras variou em função das condições do ambiente e do tempo de exposição.

Figura 16. Comportamento higroscópico do fármaco sulfato de hidroxiclороquina em diferentes condições de umidade relativa do ar.



Na condição de 28% de UR, foi possível identificar o equilíbrio de sorção e dessorção de água, havendo pontos onde não houve variação da porcentagem de peso. Isso se deve, principalmente, à capacidade da sílica em sorver umidade. Tal resultado corrobora o hábito de se estocar e armazenar a matéria-prima em ambiente hermeticamente fechado contendo sílica, como dessecador.

Em altas condições de UR (65% e 100%), houve ganho de peso, traduzindo-se em água adsorvida. Os valores máximos observados foram de 1,28 e 1,81% para as condições de 65 e 95% UR, respectivamente. Entretanto, o aumento de peso não foi considerado significativo uma vez que, mesmo em condições drásticas de UR, a quantidade residual de umidade não foi superior à preconizada pela Farmacopeia Americana USP 36 (<2%).

Vale salientar que os valores de higroscopicidade obtidos não devem ser considerados absolutos, visto que as amostras foram expostas a condições extremas de UR, sem a proteção de uma embalagem primária.

No presente estudo, o ponto de fusão foi determinado a fim de avaliar a pureza do sulfato de HCQ. Para tal, duas diferentes técnicas foram realizadas: fusiômetro e DSC. De fato, as informações adquiridas demonstraram-se consonantes, sendo o grau de pureza calculado pelo DSC, de maior confiabilidade.

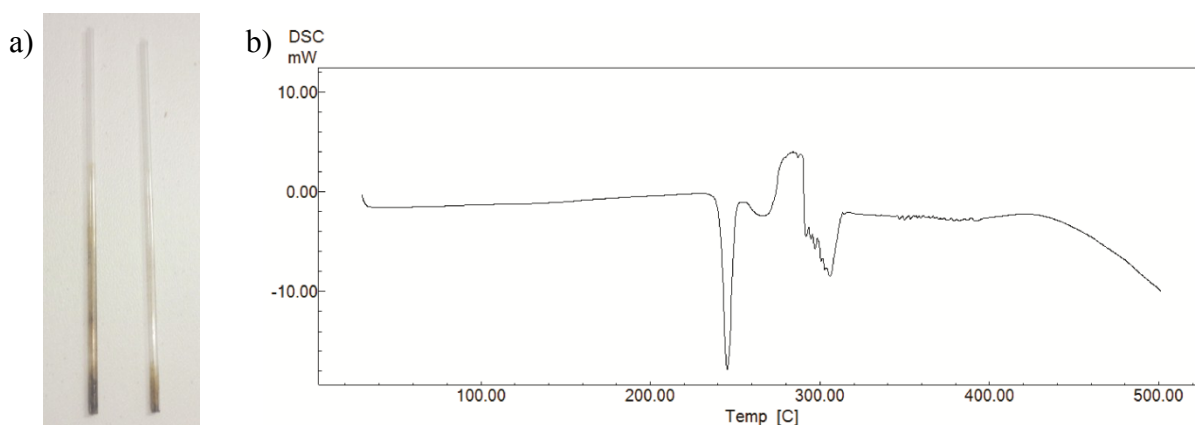
À priori, a faixa do ponto de fusão foi determinada através da utilização de fusiômetro. Com o auxílio da ocular e de termômetro, pôde-se observar o início do evento endotérmico em, aproximadamente, 238°C. Logo após ser possível observar a fusão, ao atingir a temperatura de cerca de 243°C, o material passou a ter coloração negra, sugerindo possível degradação conseguinte à fusão da matéria-prima (figura 17.a). De fato, essa informação pôde ser corroborada por meio dos resultados obtidos da curva DSC do fármaco.

De acordo com o valor de fusão do sulfato de HCQ foi possível determinar a pureza de $98,85 \pm 0,6\%$ (valor de compensação de aproximadamente 8%) para este fármaco com o auxílio do Software TA-60 versão 1.0 (Shimadzu®, Kyoto, Japan). Este valor encontra-se de acordo com o que preconiza a Farmacopeia Americana que determina uma especificação de 98 a 102% do fármaco dessecado permitindo assim a utilização desta matéria-prima (USP 36 – NF 31, 2013).

A curva DSC do sulfato de hidroxicloroquina (figura 17.b) apresentou quatro eventos, todos de natureza endotérmica. O primeiro, amplo e bastante intenso, observado na faixa de temperatura entre 242,23-254,90°C ($DSC_{pico}=244^{\circ}C$) correspondendo ao processo de fusão do fármaco ($\Delta H = -396,51 \text{ J.g}^{-1}$). O evento de fusão do fármaco é incompleto, com a primeira etapa de degradação sobrepondo o pico de fusão, em uma faixa compreendida entre 261,88-

297,55°C ($\Delta H = -185,85 \text{ J.g}^{-1}$), sendo representado por um pico amplo de intensidade reduzida. Nota-se que os eventos da degradação subsequentes relativos aos dois últimos eventos de perda de massa são também endotérmicos e evidenciados pela primeira derivada da curva termogravimétrica. O terceiro e quarto eventos ocorrem nas faixas entre 290,22-311,61°C e 329,18-341,10°C.

Figura 17. a) Capilares utilizados no fusiômetro; b) Curva DSC do sulfato de hidroxiclороquina.



A estrutura dos materiais sólidos é resultado da natureza de suas ligações químicas, a qual define sua distribuição espacial. Um material cristalino, independente do tipo de ligação encontrada no mesmo, apresenta um agrupamento ordenado de seus átomos, íons ou moléculas, que se repete nas três dimensões. Para elucidação da estrutura cristalina do sulfato de HCQ, técnicas de imagem foram requeridas: DR-X e MEV.

A difração de raios-X é uma técnica de grande versatilidade e rapidez aplicada a amostras policristalinas. Ela permite o monitoramento de amostras quando no desenvolvimento de produtos farmacêuticos em laboratórios e o controle de qualidade industrial, fornecendo informações importantes sobre tamanho e estrutura dos cristais (SANTANA, RAMOS & FABRIS, 2008).

O perfil difratométrico (figura 18) do fármaco revelou a presença de 2 picos de maior intensidade: 17,18° e 17,24°, além da existência de diversos picos secundários de menor intensidade, evidenciando a natureza cristalina do sulfato de HCQ. Tal comportamento foi corroborado pelas fotomicrografias obtidas por MEV (figura 19), nas quais evidenciou-se a existência de cristais de tamanhos irregulares com formatos predominantemente hexagonais.

Figura 18. Difratoograma de raios-X do sulfato de hidroxiclороquina

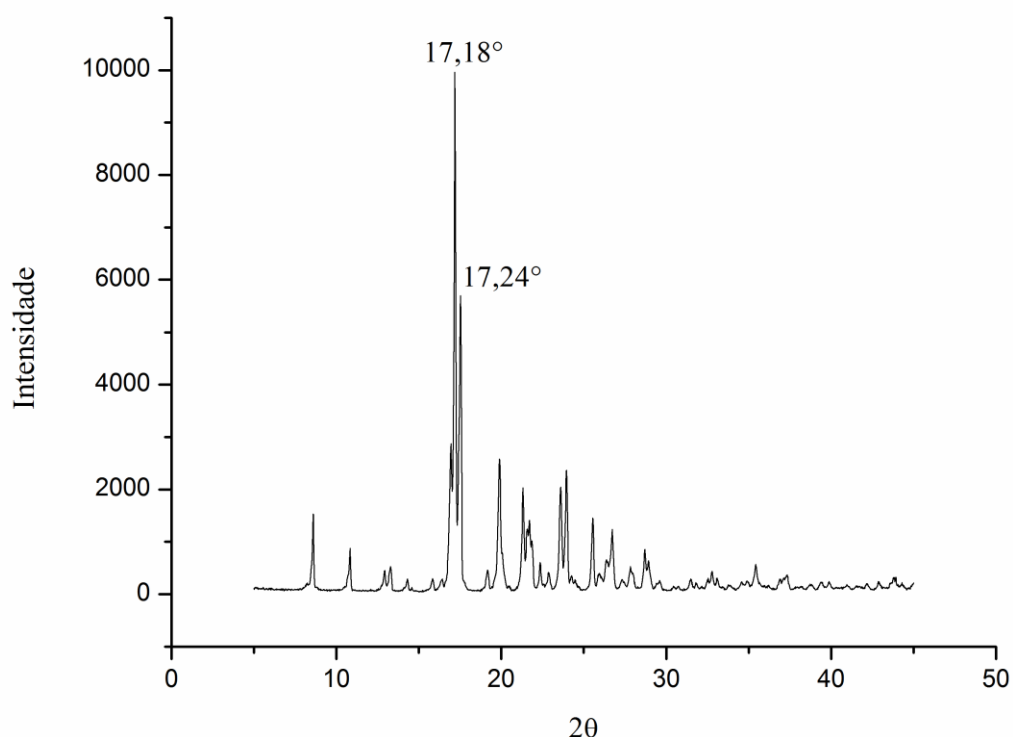
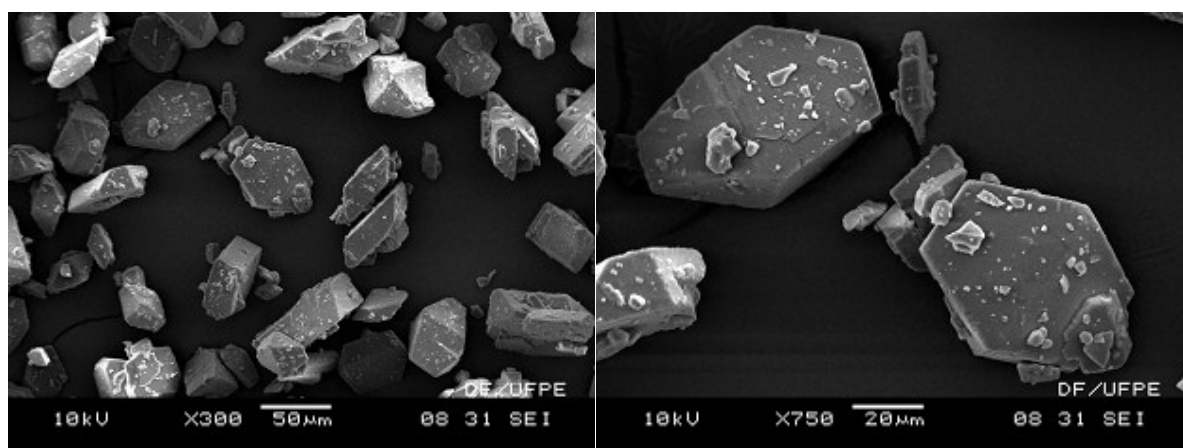


Figura 19. Micrografias de varredura do sulfato de hidroxiclороquina com aumentos de 300 e 750 vezes.



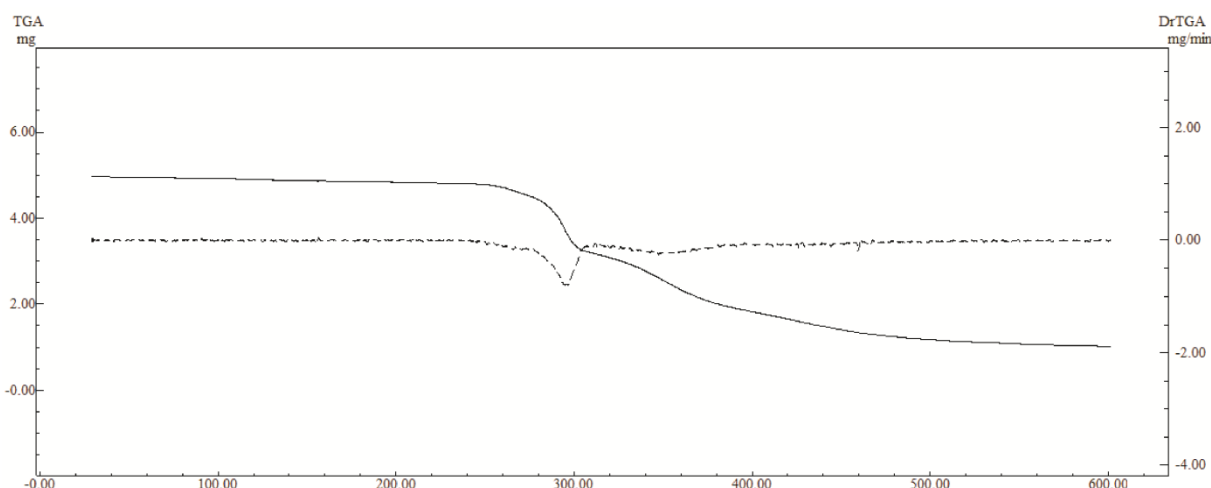
O uso da técnica do MEV vem se tornando mais frequente por fornecer informações detalhadas do estado de cristalização. Com aumentos de até 300.000 vezes, consiste em ferramenta importante na detecção de mudanças cristalinas em decorrência de variações dos processos de síntese ou do processamento farmacêutico, o que pode vir a formar outras polimórficas do fármaco (RIBEIRO et al., 2003).

Esses resultados têm influência significativa na solubilidade e permeabilidade intrínsecas do fármaco e, principalmente, na procura por formas polimórficas. Em associação a técnicas analíticas como DSC e TG, é possível gerar robusto dossiê sobre a caracterização cristalina da amostra (SOARES-SORBINHO et al., 2010).

O uso da análise termogravimétrica foi indispensável na elucidação da degradação da HCQ frente à temperatura. A TG mede as alterações da massa da amostra em função do tempo ou temperatura. Os processos de dessolvatação ou de decomposição são muitas vezes acompanhados através desta análise. A comparação dos resultados de TG e DSC, obtidos em condições semelhantes, pode ser de grande valia para a interpretação dos processos térmicos.

A curva TG do sulfato de HCQ está apresentada na figura 20. Foram observados três eventos de perda de massa ao longo da análise. O primeiro, concomitante ao final do evento relativo à fusão do fármaco, com início em 254,78°C e término em 278,01°C resulta em uma perda de massa de 5,56% da massa inicial (DTGpico=269,41°C). O segundo, na faixa de temperatura compreendida entre 288,55-301,16°C, apresenta uma clara etapa de perda de massa de 20,9% (DTGpico=293,62°C). O terceiro e último evento, observado entre 335,03-378,32°C, corresponde a uma perda de massa de 29,23% (DTGpico= 353,86°C). Todos os eventos de perda de massa são mais bem evidenciados com a utilização da derivada da curva TG (DTG).

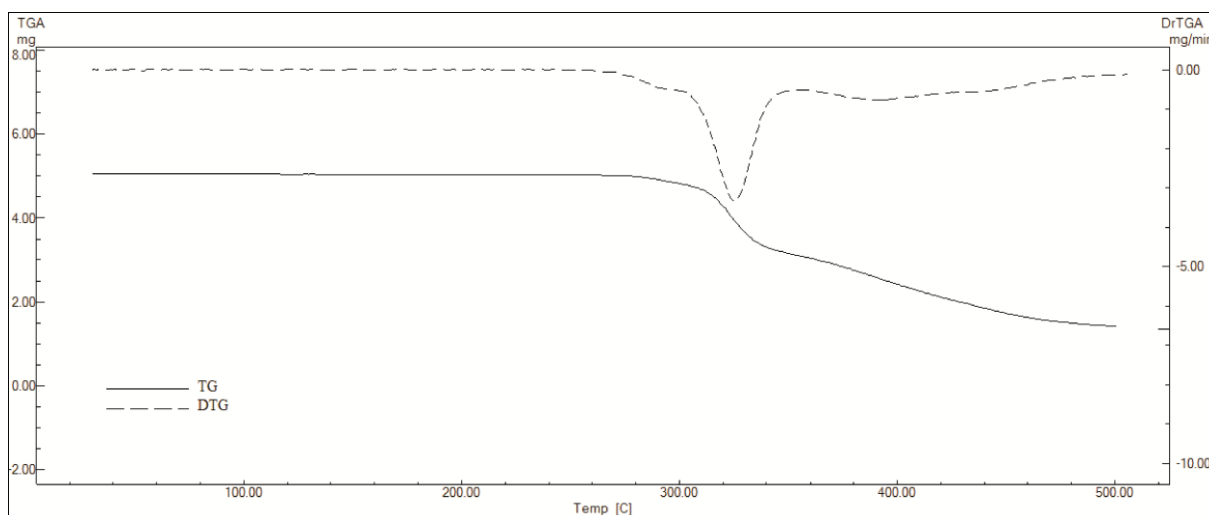
Figura 20. Curva TG/DTG do sulfato de hidroxicloroquina.



Durante a análise da cinética da reação sob condições não-isotérmicas, percebeu-se que, com o aumento da razão de aquecimento, há o aparecimento de um novo evento. A alteração do comportamento térmico do fármaco é vista nas seguintes razões de aquecimento: 20 e 40 °C.min⁻¹, sendo mais bem evidenciado por esta última, razão pela qual ela foi escolhida para caracterizar este novo evento (figura 21). O quarto evento tem seu início em 439,85 °C e

término em 460,57°C, resultando em uma perda de massa de 7,53% ($DTG_{pico} = 450,83^\circ C$) da massa inicial.

Figura 21. Curva TG/DTG do sulfato de hidroxicloroquina ($\beta = 40^\circ C/min$)



A dissolução pode ser definida como o processo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. A dissolução do fármaco nos fluidos gastrointestinais é pré-requisito para a absorção, seguida da sua distribuição pela circulação sistêmica. Em parte, a dissolução depende do meio que o rodeia. Testes de dissolução *in vitro* é ferramenta imprescindível para controle de qualidade em diferentes estágios de ciclo de vida de um medicamento (AZAMI, ROA & LOBERBERG, 2007).

Para determinar os meios a serem utilizados nos estudos de dissolução e para conhecer a solubilidade intrínseca do sulfato de HCQ em determinados solventes, o ensaio quantitativo de solubilidade foi realizado.

Corroborando com o ensaio semi-quantitativo de solubilidade, foi observado que, em água e nas soluções aquosas de diferentes pH's, as partículas apresentaram grande solubilidade, mostrando que, mesmo em excesso, o material foi solubilizado após o teste. Dessa forma, foi decidido quantificar apenas o teor daquelas amostras onde o sulfato de HCQ demonstrou-se muito pouco solúvel. Os resultados estão sumarizados na tabela 10.

Diante da existência de método descrito por compêndios oficiais, o presente estudo propôs pequenas alterações no pH do meio aquoso de dissolução. Tais alterações basearam-se na obtenção de soluções-tampão capazes de simular as condições do trato gastrointestinal e utilizá-las como meios de dissolução (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). Os resultados

obtidos foram comparados através da eficiência de dissolução (ED), calculada a partir da equação 8 (Onde: ASC é a área sob a curva do tempo que se deseja avaliar e ATG, a área total do gráfico).

$$\text{Equação 8. ED} = \frac{(\text{ASCt})}{\text{ATG}} \times 100$$

Tabela 10. Resultados experimentais dos solventes onde o sulfato de hidroxiclороquina se apresentou pouco solúvel.

Solvente	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Teor (%)
Acetonitrila	9,38	40,79
Acetona	13,67	59,42
Álcool Metílico	4,77	20,74
Álcool Etílico	6,22	27,03
Álcool Isopropílico	5,49	23,88

Os resultados do estudo de dissolução confirmaram a ótima solubilidade em água do sulfato de HCQ, conforme mostrado pela literatura (USP 36 – NF 31, 2013) e pelo presente trabalho. Foi verificado que o pH do meio de dissolução influenciou consideravelmente a concentração de fármaco dissolvida nos primeiros cinco (5) minutos. Entretanto, no intervalo médio do ensaio (30 minutos), os valores de todos os métodos são bastante semelhantes, mostrando a grande solubilidade do sulfato de HCQ (>85%). Os resultados estão sumarizados na tabela 11.

Tabela 11. Porcentagem de sulfato de hidroxiclороquina dissolvida em soluções aquosas em diferentes pH's

Tempo (min)	Porcentagem de sulfato de HCQ dissolvida			
	pH 1,2	pH 6,6	pH 7,0	pH 8,0
0	0	0	0	0
5	89,46	17,74	13,20	29,56
15	82,26	86,66	73,08	77,54
30	88,84	90,05	86,29	85,98
45	89,11	90,05	87,26	87,52
60	91,03	90,42	90,51	89,46

Devido à grande semelhança dos resultados, viu-se a necessidade de avaliá-los de maneira diferente, de forma tal que fosse possível compará-los mais eficientemente. A ED foi então selecionada como parâmetro de diferenciação. O termo “ED” foi primeiramente empregado por Khan & Rhodes (1975), podendo apresentar uma gama de valores dependendo dos intervalos de tempo escolhidos. Para que o fármaco esteja disponível para absorção sistêmica é necessário garantir que não haja interação entre ele e os demais componentes de uma formulação, como os excipientes, por exemplo. A ED consiste na avaliação integral comparativa da ASC do perfil de dissolução em relação à área representada pelo tempo total do ensaio. Dentre as aplicabilidades da ED, pode-se destacar: verificação das características intrínsecas do fármaco submetidos a diferentes meios; comparação entre diferentes formulações, no caso de estudos de bioequivalência (MAHLE et al., 2007).

De fato, a ED possibilitou a diferenciação dos resultados (Tabela 12). Viu-se que, em 5 minutos, a ED para o pH 1,2 é quase quatro vezes maior que as demais. Também foi observado que em 30 minutos, os valores de ED são bastante semelhantes, confirmando a hipótese citada acima. Assim, os resultados obtidos fornecem a informação de que o intervalo crítico de tempo para a dissolução do fármaco é de apenas 5 minutos, valor bastante pequeno, comprovando a grande solubilidade aquosa do sulfato de HCQ em diferentes pH's e, principalmente, em meio ácido.

Tabela 12. Eficiência de dissolução para o sulfato de HCQ nos tempos 5 e 30 minutos.

pH	ED _{5min} (%)	ED _{30min} (%)
1,2	4,43	46,83
6,6	0,96	41,16
7,0	0,77	38,65
8,0	1,66	41,12

5.1.3 Caracterização a nível de aglomerados de partículas

O entendimento sobre os pós permite qualificar e quantificar fatores que não podem ser negligenciados durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas. Isso exerce influência

na alimentação uniforme das máquinas e nas propriedades físicas e mecânicas dos comprimidos (MARSHALL, 2001).

Na avaliação da descrição e análise macroscópica da matéria-prima, essa se demonstrou como pó branco cristalino e inodoro, conforme descrito pelo laudo do fornecedor.

Quanto à caracterização reológica, foi observado tempo de escoamento de menos de um (1) segundo, seguido de obtenção do resultado do ângulo de repouso, de 6,28°. Conforme descrito em literatura, tais valores indicam que o material possui excelente fluxo (WELLS, 2005)

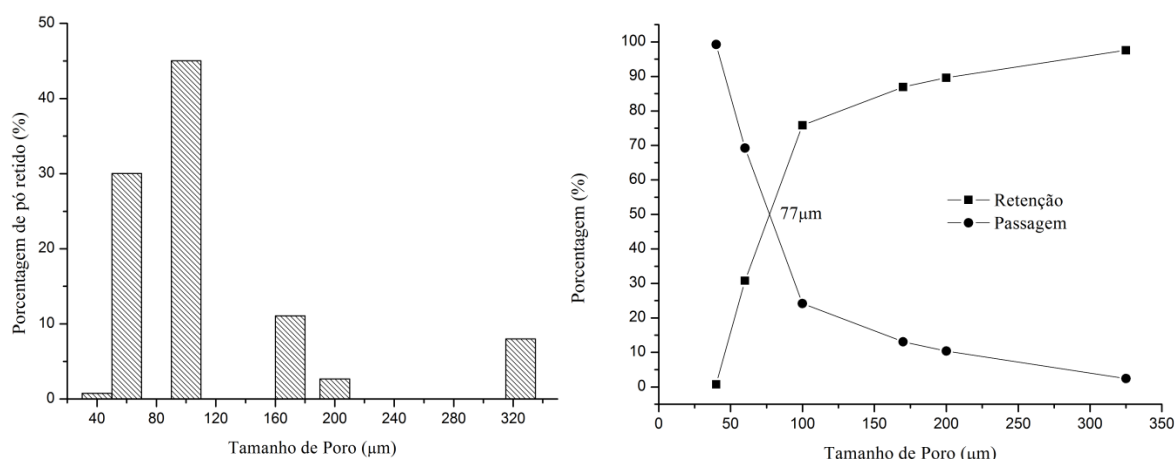
Quanto à avaliação da densidade, foram obtidos os seguintes valores: 0,77 e 0,83 g/mL; para a densidade aparente e a densidade compactada, respectivamente. A partir desses valores, é possível avaliar o nível compressibilidade do material por meio do cálculo dos índices de Carr (IC) e de Hausner (IH). Para o sulfato de HCQ, foram obtidos os seguintes resultados: 1,08 e 7,22%; para IH e IC, respectivamente. Conforme descrito na literatura, há a indicação de que a matéria-prima tem bom fluxo e não necessita da incorporação de adjuvantes deslizantes, como o aerosil[®] 0,2%. Vale salientar que valores acima de 20% para o IC e valores compreendidos entre 1,25 e 1,5 caracterizam fluxo ruim e carência da adição de deslizantes. Entretanto, os índices acima mencionados, muitas vezes, são determinações pontuais e nem sempre refletem a facilidade ou velocidade da consolidação das partículas, fator importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, uma vez que está diretamente relacionado com o preenchimento uniforme das máquinas de compressão. Logo, faz-se necessária a avaliação do conjunto de todas as caracterizações físicas obtidas para delinear o melhor roteiro de obtenção da formulação (FIESE & HAGEN, 2001; WELLS, 2005).

Por meio da distribuição granulométrica realizada, pôde-se observar que matéria-prima apresenta prevalência de suas partículas distribuídas no intervalo entre 60 e 100 µm (Figura 22.a). Diante desses resultados, foi realizada avaliação da retenção em relação à passagem das partículas nos intervalos mencionados. Foi observado que o tamanho médio das partículas é de aproximadamente 77 µm (Figura 22.b). Portanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, pode-se classificar a matéria-prima utilizada como um pó finíssimo, visto que praticamente todas as partículas passam pelo tamis com abertura nominal de malha de 125 µm e de acordo com o gráfico de barras da repartição granulométrica que simula uma distribuição normal da Curva de Gauss (BRASIL, 2010).

Devido ao pequeno tamanho das partículas e a relativa higroscopicidade, ambos evidenciados no presente estudo, uma avaliação do conjunto dos resultados obtidos deve ser

feita. Essas situações podem ser etapas limitantes no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, principalmente comprimidos, uma vez que o material pode obstruir a máquina compressora ou gerar problemas de uniformidade de conteúdo.

Figura 22. a) Repartição granulométrica; (b) tamanho médio de partícula do sulfato de hidroxyclorequina.



A área superficial de partículas pode estar relacionada às propriedades físico-químicas e farmacodinâmicas de um insumo farmacêutico ativo. Ela pode interferir, tanto na liberação do fármaco da sua forma farmacêutica, quanto nas propriedades reológicas de materiais pulverulentos. O método BET, utilizado para o cálculo dessa área superficial, baseia-se na determinação do volume de nitrogênio adsorvido, a diversas pressões relativas, na temperatura do nitrogênio líquido (LIMA, 2000).

Os métodos que utilizam a adsorção física de gases são frequentemente utilizados para determinar a distribuição de poros de acordo com o seu tamanho. Segundo a IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry), classifica-se o tamanho de poros como: microporo (largura interna menor que 20 Å), mesoporo (largura interna entre 20 e 500 Å) ou macroporo (largura interna maior que 500 Å) (NERY et al., 2008; LIMA, 2000).

Foi observado que o sulfato de HCQ possui mesoporos por apresentar tamanho de poro de aproximadamente 226.828 Å. Esse tamanho de poro é adequado para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas, uma vez que encontra-se na média de valores que indicariam incapacidade de solubilização devido ao pequeno tamanho de poro (microporo) e problemas de consolidação de partículas devido grande tamanho do poro (macroporo).

Os resultados 0,73 m²/g, 0.000264 e 0.000099 cm³/g expressam a superfície específica e volume de poros e microporos, respectivamente. Tais valores entram em consonância com

os resultados obtidos na investigação das propriedades reológicas, sugerindo que não há necessidade da adição de adjuvantes que promovam o incremento da área superficial e, por consequência, da solubilidade.

Tabela 13. Parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio na determinação de superfície específica e tamanho de poro do sulfato de hidroxiclороquina.

Superfície específica – BET (m²/g)	Volume de poros (cm³/g)	Volume de microporos (cm³/g)	Tamanho de poros (Å)
0.73 m ² /g	0.000264 cm ³ /g	0.000099 cm ³ /g	226.828 Å

5.1.4 Caracterização a nível de teor de água

A determinação da umidade residual em matérias-primas é ensaio de grande relevância na produção de medicamentos. O alto teor de água propicia a proliferação de micro-organismos; possibilita a degradação de princípios ativos pelos processos de hidrólise e influencia a qualidade farmacotécnica dos materiais sólidos pulverulentos, podendo afetar, em especial, suas características reológicas e a estabilidade físico-química (GARCIA-AMOEDO & ALMEIDA-MURADIAN, 2002; BORGES et al., 2005).

Diversos métodos analíticos podem ser empregados na determinação de umidade residual. O presente estudou destacou as seguintes técnicas: determinação de perda por dessecação, método termogravimétrico através de TG, analisador de umidade por infravermelho e determinação de água pelo método volumétrico (Karl Fischer).

Os resultados obtidos demonstraram-se em consonância com aqueles preconizados pela monografia do fármaco presente na Farmacopeia Americana, uma vez que, em todas as análises efetuadas, o teor de água foi menor que 2% (USP 36 – NF 31, 2013).

5.1.5 Desenvolvimento e otimização de método analítico para doseamento do fármaco

O sulfato de HCQ farmacologicamente ativo é uma mistura racêmica de dois isômeros ópticos que são quantificados sem separação quiral, havendo, então, a co-eluição destes. Portanto, o princípio determinante da otimização do método analítico para determinação de teor foi o fator de cauda do pico resposta referente ao HCQ. Utilizando o fator de cauda como

a variável dependente, foi realizado um planejamento fatorial 3^3 (Tabela 14) com os seguintes fatores: fluxo e composição da fase móvel em combinação com a temperatura da coluna cromatográfica, pelo modelo de *Box-Behnken*.

A partir da análise dos gráficos de superfície-resposta obtidos pelo software Statistica versão 8.0 (StatSoft®, Tulsa, USA) é possível observar as condições em que a interação entre os fatores analisados geram picos-resposta do analito que possuem fator de cauda com valor numérico mais próximo de 1 (indicado pelas cores verdes claro e escuro). O *Design Space* está inserido dentro dos valores compreendidos entre 0,98 e 1,2 para valores de fator de cauda, conforme ilustrados na figura 23 (a,b e c).

Esta ferramenta possibilitou a otimização do método analítico para determinação de teor, estabelecendo como condição analítica ideal (realce na tabela 14): a temperatura de 45°C, a um fluxo de FM de 0,8 mL/min, em uma proporção de 80:20 Fase Móvel:Metanol como fase eluente.

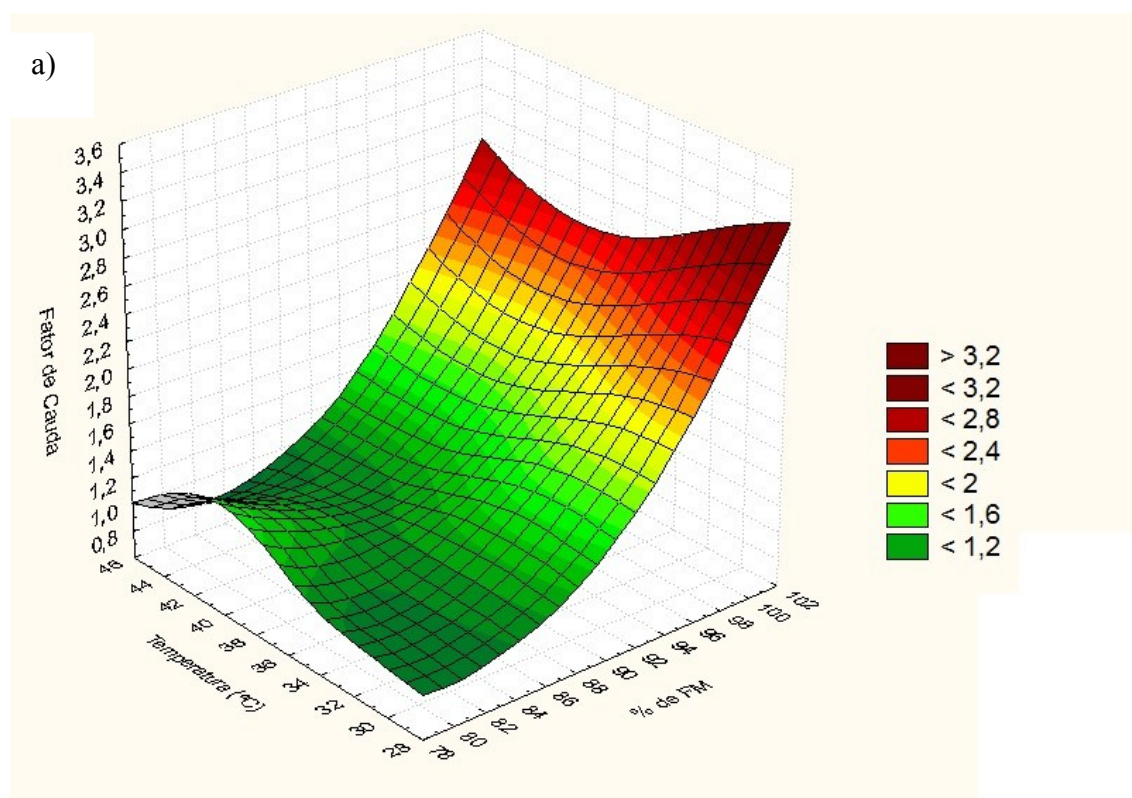
Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 3^3 para otimização do método analítico de quantificação do sulfato de hidroxicloroquina.

Método	Fluxo de fase-móvel (mL/min)	Temperatura (°C)	Composição de fase-móvel (Fase Móvel USP:Metanol)
1	1,0	40	90:10
2	1,0	45	90:10
3	1,0	35	90:10
4	1,2	40	90:10
5	1,2	45	90:10
6	1,2	35	90:10
7	0,8	40	90:10
8	0,8	45	90:10
9	0,8	35	90:10
10	1,2	45	80:20
11	1,2	40	80:20
12	1,2	35	80:20
13	1,0	35	80:20
14	1,0	40	80:20

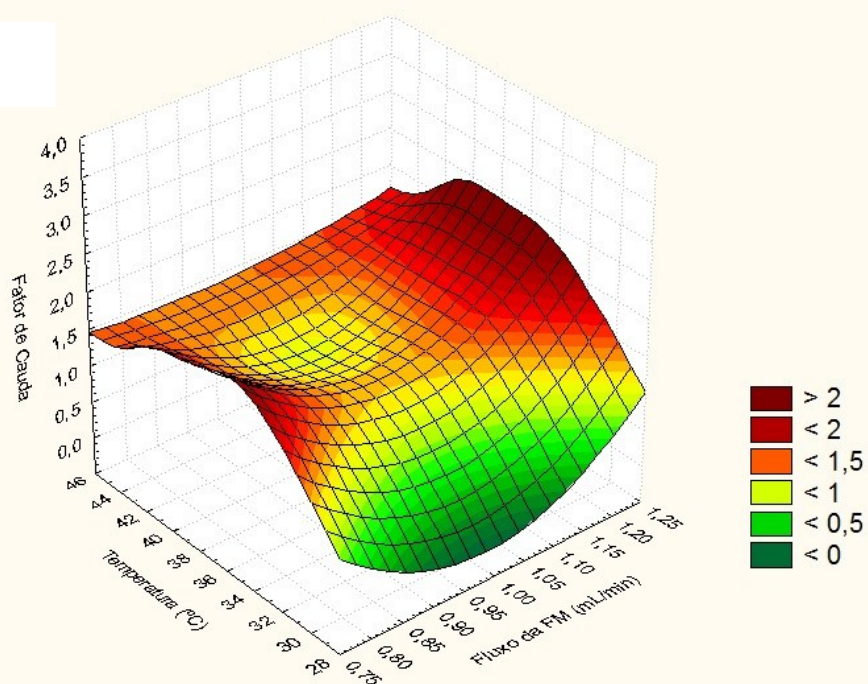
15	1,0	45	80:20
16	0,8	45	80:20
17	0,8	40	80:20
18	0,8	35	80:20

A partir deste método otimizado foi possível realizar a análise de teor do sulfato de HCQ, demonstrando resultado satisfatório (99,18%) dentro do intervalo preconizado pela monografia específica do fármaco na Farmacopeia Americana e condizente à pureza evidenciada pela curva DSC (USP 36 – NF 31, 2013).

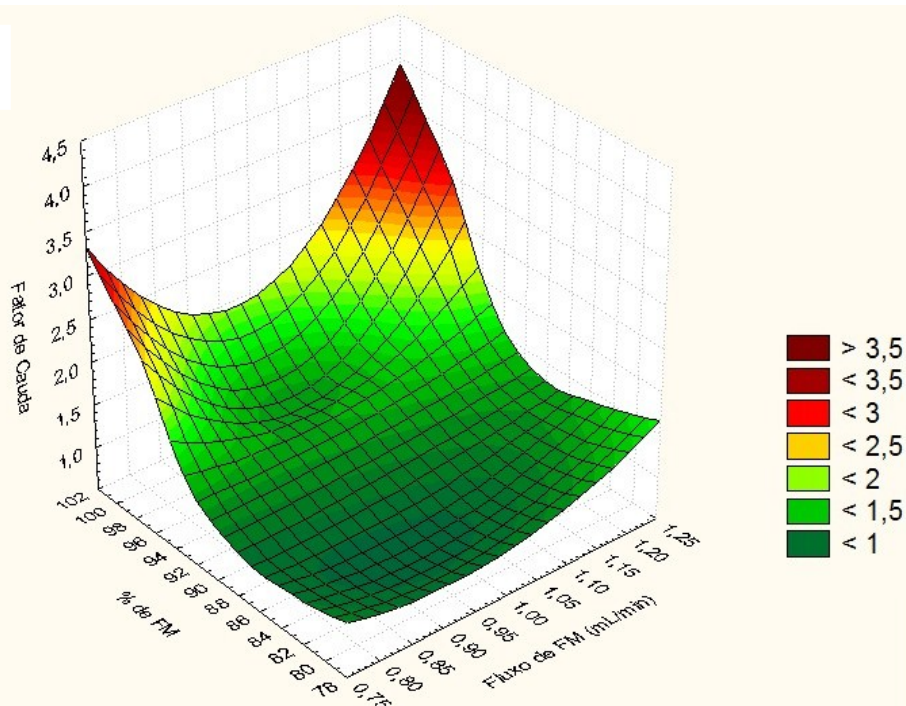
Figura 23. Gráficos de superfície-resposta correlacionando o fator de cauda do pico resposta da HCQ ao fluxo e composição da fase móvel bem como a temperatura da coluna cromatográfica.



b)



c)



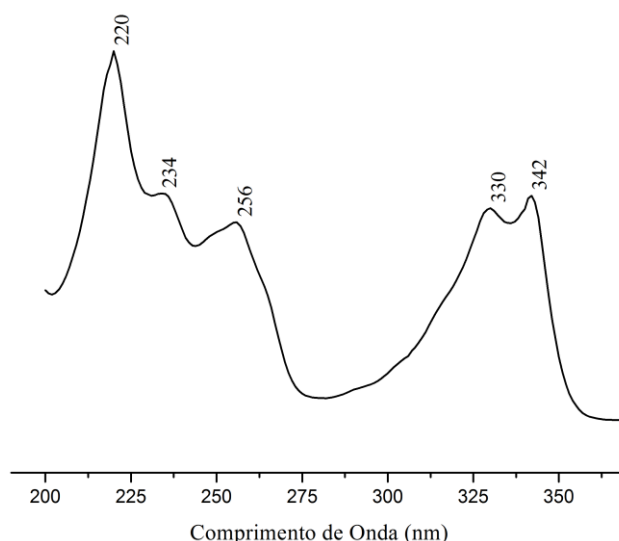
5.2 *QUALITY BY DESIGN* NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA DOSEAMENTO DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA

A seguir, estão descritos os resultados obtidos e a respectiva discussão no que tange o método desenvolvido por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível para quantificação do sulfato de hidroxycoloroquina.

5.2.1 *Desenvolvimento do método*

A varredura espectrofotométrica de sulfato de HCQ mostrou 5 máximos de absorção nos seguintes comprimentos de onda: 220, 234, 256, 330 e 342 nm (figura 24). Tais valores correspondem à presença de grupos cromóforos presentes na molécula. Esta última e maior delas é atribuída ao grupo quinolínico e, portanto, foi a selecionada como comprimento de onda para a análise das amostras (USP 36 – NF 31, 2013; ARGUELHO, ANDRADE & STRADIOTTO, 2002).

Figura 24. Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxycoloroquina.



5.2.2 *Otimização do método*

Toda a concepção da otimização do método está descrita a seguir.

5.2.2.1 Preparo da Amostra

A modificação do preparo da amostra que consiste em realizar apenas uma diluição para alcançar a concentração de leitura, demonstrou-se satisfatória. O teste *t-Student* foi utilizado para evidenciar se houve diferença entre as médias obtidas. Nesse caso, a hipótese nula (H_0) deve ser aceita, uma vez que o t_{cal} foi menor que o t_{tab} com 95% de intervalo de confiança e 5 graus de liberdade (tabela 15). Isso implica em dizer que as médias obtidas são estatisticamente iguais entre si e que apenas uma diluição pode ser utilizada para o preparo da amostra.

De fato, houve redução no tempo gasto para preparar a amostra (de ± 40 min para ± 15 min). Também foi possível evitar a inserção de novos erros aleatórios oriundos de mais de uma diluição. Isso pode ser corroborado devido a maior precisão entre as amostras preparadas a partir de apenas uma diluição.

Tabela 15. Comparação entre os resultados obtidos das análises realizadas com as diferentes formas de preparação de amostra e tratamento estatístico presumindo diferentes variâncias

Preparo da amostra	Amostras – Concentração ($\mu\text{g/mL}$)			Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão	t_{cal}	$t_{(0,95,5)}$
	1	2	3				
Diluição Direta	10,90	10,96	10,94	10,93	0,033	0,0011	2,1318
2 Diluições	10,49	10,53	10,57	10,53	0,043		

5.2.2.2 Planejamento fatorial 2^2 para otimização do método

Para os resultados da análise fatorial da influência da solução diluente e agitação em banho ultrassônico foram obtidos os resultados descritos na tabela 16 e 17.

Tabela 16. Matriz do planejamento fatorial 2² do método analítico de quantificação do sulfato de hidroxiclороquina.

Ensaio	Resultado			Média	Variância
	1	2	3		
1	0,455	0,441	0,455	0,450	6,53.10 ⁻⁵
2	0,427	0,417	0,421	0,422	2,5.10 ⁻⁵
3	0,452	0,462	0,472	0,462	1,00.10 ⁻⁴
4	0,456	0,443	0,442	0,447	6,10.10 ⁻⁵

Tabela 17. Influência dos fatores: solução diluente e sonicação e da interação entre eles.

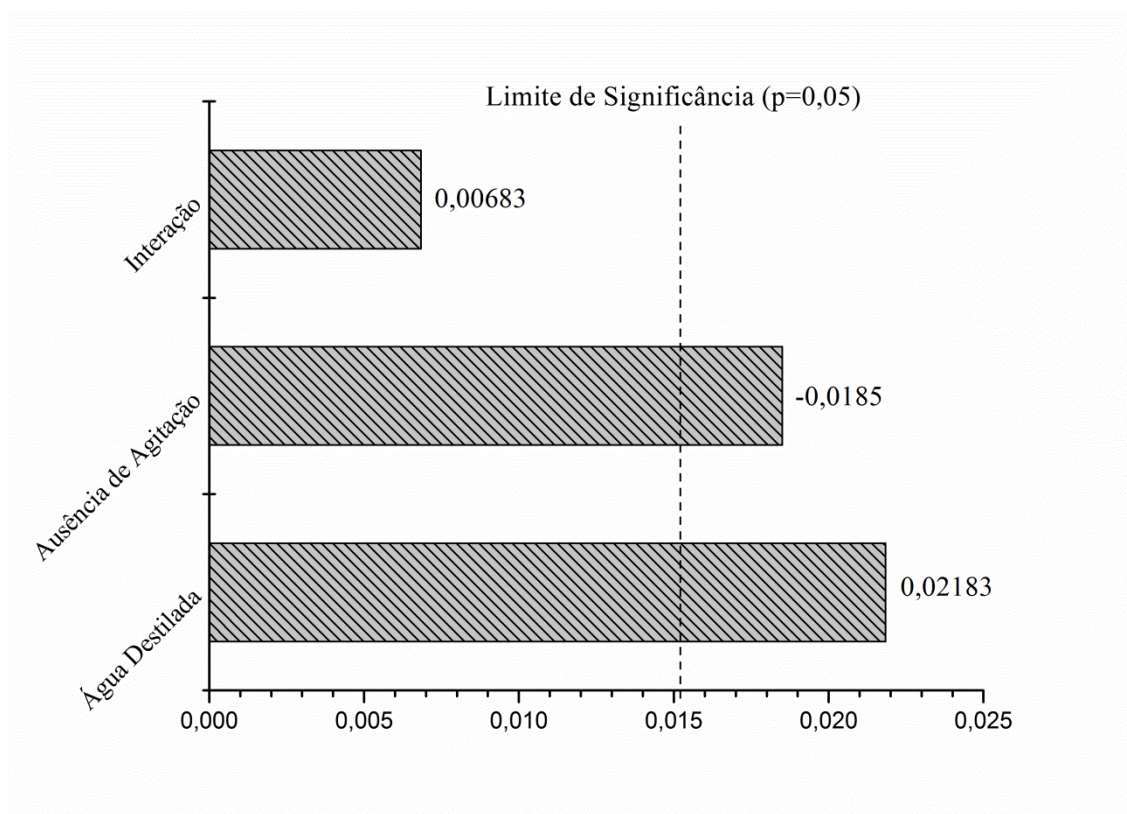
Níveis	-	+	-	+	Influência
Solução diluente	-0,450	0,422	-0,462	0,477	0,0185
Sonicação	-0,450	0,462	-0,422	0,477	-0,02183
Interação	-0,462	0,450	-0,422	0,447	0,006833

Os sinais dos resultados da influência indicam qual nível exerce maior influência. Entretanto, para ser significativa, o valor apresentado tem que ser maior que o limite de significância, calculado através da seguinte equação:

$$\text{Equação 9: Limite de Significância} = \sqrt{\frac{\sum \sigma^2}{2}} \cdot 2,776$$

O Gráfico de Pareto (figura 25) evidencia os valores dos efeitos estimados, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos. Aqui, o efeito é tão significativo quanto mais à direita da linha tracejada, pois esta corresponde ao limite de significância, calculado para o intervalo de confiança de 95%. Segundo o gráfico, a utilização de água destilada como solução diluente é o fator que exerce maior influência sobre a precisão do método. Outra informação importante obtida do gráfico é a significativa influência da ausência da sonicação que, como apresentado no gráfico, ocorre de forma inversa, uma vez que corresponde ao nível negativo do fator. O valor à esquerda do limite de significância evidencia que não há influência significativa quando a interação entre os fatores é avaliada.

Figura 25. Gráfico de Pareto



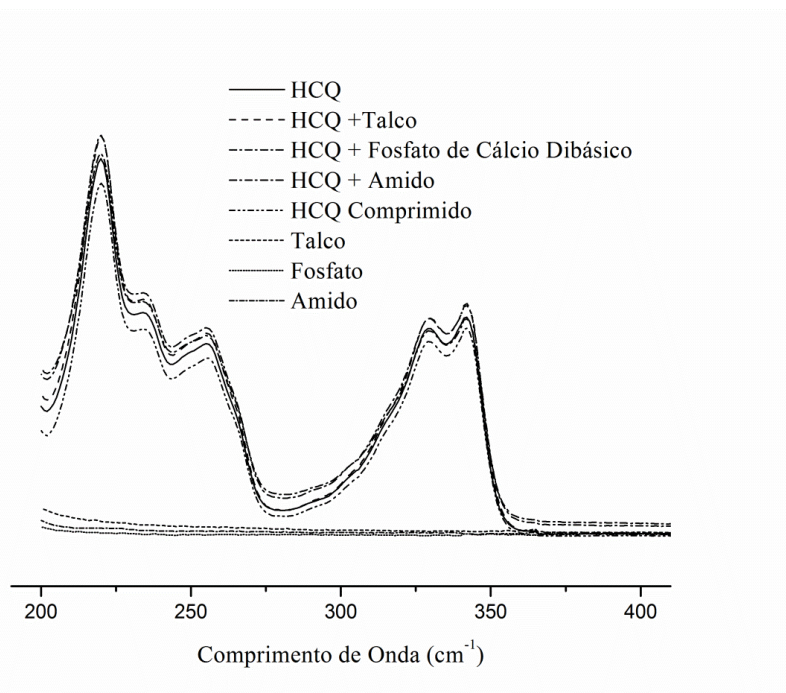
Os resultados obtidos evidenciam as vantagens do método. A não necessidade de agitação gera economia de energia elétrica e possibilita a rápida preparação da amostra. Assim, o método torna-se mais rápido e satisfatório. A alteração da solução diluente de HCl 0,01M para água destilada satisfaz alguns dos princípios da química verde propostos por Anastas & Warner (1989) e Machado (2012), tais como: os princípios 1 e 2 (prevenção de resíduos e mais segurança inerente quanto à acidentes, respectivamente); o princípio 22 (quantificação e minimização do uso de "utilidades", como água e eletricidade) e o princípio 24 (monitorização, registro e minimização dos resíduos). Com isso, evidenciamos que o método, além de adequado, se encaixa aos conceitos de sustentabilidade.

5.2.2.3 Validação do Método

A Figura 26 apresenta os espectros sobrepostos do sulfato de HCQ, da amostra de sulfato de HCQ contaminada com excipientes constituintes da formulação sólida e da própria forma farmacêutica (comprimido – Plaquinol[®]). As varreduras evidenciaram apenas os picos característicos de absorção máxima do sulfato de HCQ (220, 234, 256, 330 e 342 nm)

confirmando que o método é específico à detecção e quantificação do fármaco, mesmo que este esteja na presença de outros compostos, como excipientes e adjuvantes farmacêuticos.

Figura 26. Varreduras espectrofotométricas da HCQ isolada, contaminada com excipientes e da forma farmacêutica comprimido Plaquinol®.



Para determinação da seletividade do método, foi proposta a submissão de amostras a condições de estresse a fim de demonstrar que os produtos de degradação não interferem no método. Como previsto, as condições promoveram significativa redução do teor das amostras analisadas o que indica que produtos de degradação foram formados e estes, por sua vez, não influenciam no doseamento do fármaco, já que a absorbância obtida de cada uma das amostras é praticamente a igual àquela teórica calculada quando comparada a análise realizada por CLAE-DAD de acordo com a monografia da Farmacopeia Americana. Dessa forma, o método se apresentou sensível o suficiente para evitar que a presença de estruturas similares decorrentes da degradação não interfira no doseamento do sulfato de HCQ.

Os resultados dos pontos obtidos das três curvas autênticas de amostras de sulfato de HCQ estão evidenciados na figura 27.a). Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi possível determinar o valor do coeficiente de correlação $r^2=0,99925$. Esse valor indica que 99,9% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, demonstrando que há uma correlação linear entre as duas variáveis (absorbância e concentração), uma vez que os parâmetros estão dentro dos limites mínimos preconizados ($r^2 \geq 0,99$) (ICH, 1995^b).

Tabela 18. Resultados obtidos para as análises do parâmetro seletividade

Condições	Concentração		Teor (%)	Teor degradado (%)	Absorbância esperada	Absorbância obtida
	inicial da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
NaOH 1M	10		21,82	78,18	0,085	0,087
HCl 1M	10		34,24	65,76	0,135	0,137
H ₂ O ₂	10		29,11	70,89	0,114	0,116
Fotólise	10		88,49	11,51	0,353	0,354

O gráfico de dispersão, mostrado na figura 27.b, demonstra que não houve falta de ajustes no método e que, portanto, há presença de poucos erros aleatórios, não evidenciando nenhum erro sistemático na análise, podendo ser observado pela distribuição heterocedástica dos pontos. Outra informação relevante apresentada pelo mesmo gráfico é que, pelo menos um dos pontos toca a reta. Isso quer dizer que um dos valores obtidos nas análises corresponde fidedignamente aos valores de referência (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2007).

Os valores dos LD e LQ foram de 0,38 e 1,27 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Tais valores indicam que o método é bastante sensível no que tange à detecção e quantificação do fármaco sem grandes interferências do equipamento.

O método mostrou-se preciso nos três níveis avaliados: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Tabela 19). No que tange à repetitividade, os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, apresentando a média de $10,94 \pm 0,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com coeficiente de variância de 1,15%, sendo esse valor abaixo do limite máximo preconizado pela ANVISA (5%) (BRASIL, 2003). Quanto à precisão intermediária, foi evidenciado através de tratamento estatístico por *ANOVA two-way*, que o método demonstrou-se preciso para as análises efetuadas por analistas diferentes tanto no mesmo dia quanto em dias diferentes. Isso se deve ao fato de que os valores de *F* calculados foram sempre menores que os *F* tabelados (críticos). Estes mesmos conceito e tratamento foram utilizados para evidenciar a precisão do método sobre o parâmetro reprodutibilidade.

Figura 27. a) Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade, valor de r^2 e equação da reta b) Respectivo gráfico de dispersão

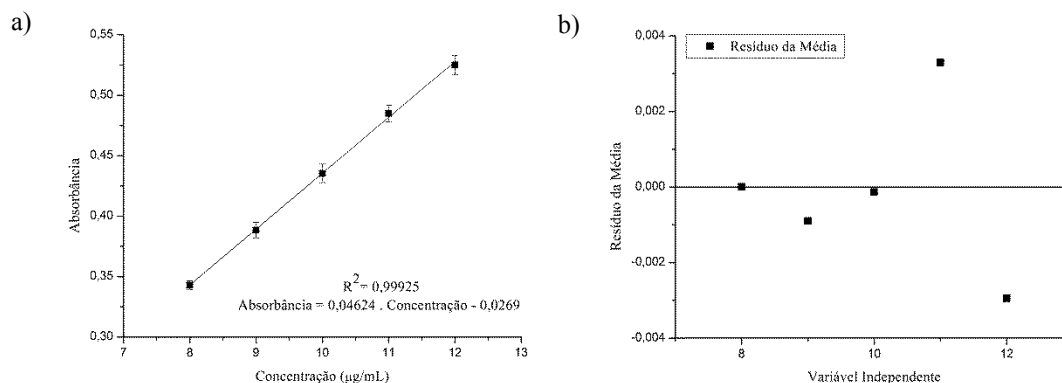


Tabela 19. Resultados obtidos para as análises do parâmetro precisão e tratamento estatístico através de coeficiente de variância e ANOVA *one-way* e ANOVA *two-way*.

Repetitividade								
	1	2	3	4	5	6	Média (µg.mL ⁻¹) ± DP	CV (%)
Amostra	10,81	10,86	10,95	10,86	11,10	11,08	10,94 ± 0,13	1,15
Precisão Intermediária								
	Dia 1	Dia 2	ANOVA two-way: Analista			ANOVA <i>two-way: Dia</i>		
Analista 1	10,58	10,51	<i>F</i> calculado: 1,29			<i>F</i> calculado: 2,84		
Analista 2	10,52	10,42	<i>F</i> tabelado: 18,51			<i>F</i> tabelado: 18,51		
Reprodutibilidade								
	1	2	3	4	5	6	Média	ANOVA <i>one- way</i>
LTM	10,33	10,58	10,61	10,51	10,28	10,46	10,46	<i>F</i> calculado: 0,38
NCQMC	10,37	10,38	10,54	10,86	10,72	10,28	10,53	<i>F</i> tabelado: 4,96

A exatidão do método foi avaliada comparando cada uma das concentrações teóricas e reais, através de teste *t-Student* presumindo variâncias equivalentes. Os resultados do parâmetro mencionado estão dispostos na tabela 20.

Tabela 20. Resultados obtidos para as análises do parâmetro exatidão e tratamento estatístico teste *t-Student* presumindo variâncias equivalentes.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resultados			Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP	Teste <i>t-Student</i>
	1	2	3		
5	5,07	4,92	5,05	5,01 $\pm$ 0,08	<i>t</i> calculado (bi-caudal): 0,90 <i>t</i> tabelado (bi-caudal): 4,30
10	9,96	9,94	9,96	9,95 $\pm$ 0,01	<i>t</i> calculado (bi-caudal): 0,10 <i>t</i> tabelado (bi-caudal): 4,30
15	14,98	15,13	15,05	15,05 $\pm$ 0,07	<i>t</i> calculado (bi-caudal): 0,61 <i>t</i> tabelado (bi-caudal): 4,30

Quanto à robustez, o método apresentou considerável resistência a pequenas e deliberadas modificações às condições efetuadas nos ensaios, uma vez que todos os *F* calculados foram menores que os *F* tabelados ao se utilizar ANOVA *One-Way* como tratamento estatístico. Os resultados das análises estão sumarizados na tabela 21.

Tabela 21. Resultados obtidos para as análises do parâmetro robustez e tratamento estatístico através de ANOVA *One-Way*

Parâmetros	Variáveis	Tempo (hora)	Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP	ANOVA <i>One-Way</i>
Luminosidade	Ausência de Luz	-	10,57 $\pm$ 0,08	<i>F</i> calculado: 0,13
	Presença de Luz	-	10,58 $\pm$ 0,02	<i>F</i> tabelado: 7,70
Estabilidade	-	0	10,51 $\pm$ 0,07	<i>F</i> calculado: 1,22 <i>F</i> tabelado: 7,70
	-	2	10,55 $\pm$ 0,07	
	-	4	10,57 $\pm$ 0,06	
Comprimento de Onda	341 nm	-	10,44 $\pm$ 0,06	<i>F</i> calculado: 2,12 <i>F</i> tabelado: 7,70
	342 nm	-	10,62 $\pm$ 0,13	
	343 nm	-	10,52 $\pm$ 0,08	

5.2.3 Aplicação do método

Os resultados apresentados na Tabela 22 mostram que, com base nos valores obtidos no teste *t-Student*, não há diferenças significativas entre o método proposto e o método oficial da Farmacopeia Americana, tanto para matérias-primas quanto para a forma farmacêutica, com intervalo de confiança de 95% de significância. Na avaliação dos teores de HCQ através do método proposto no presente trabalho na matéria-prima comercial e comprimidos industrializados, os valores médios encontrados foram de 99,38 e 102,24%, respectivamente.

Segundo a Farmacopeia Americana, o sulfato de HCQ deve demonstrar um teor entre 98 a 102% para a matéria-prima e entre 93 a 107% para a forma farmacêutica. Desta forma, observou-se que ambos os materiais encontram-se dentro dos limites preconizados.

Tabela 22. Resultados obtidos para o teor de HCQ na matéria-prima e comprimidos e a tratamento estatístico teste *t-Student*

Amostra	Método proposto	Método oficial (USP 36)	t_{cal}	t_{tab}
Matéria-prima	99,38%	98,45%	0,0355	4,3027
Comprimido	102,24%	104,01%	3,3910	4,3027

5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA EXERCIDA POR UMA MISTURA DE EXCIPIENTES SOBRE O SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA EM UMA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA COMPRIMIDO ATRAVÉS DE ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

A avaliação da influência dos excipientes sobre o sulfato de HCQ foi realizada através das diferenças observadas no comportamento térmico e no estudo cinético de degradação, comparando a matéria-prima com o fármaco em uma forma farmacêutica sólida.

5.4.1. Estudo da cinética de decomposição do sulfato de hidroxiclороquina matéria-prima

Para elucidar os parâmetros cinéticos, o segundo evento foi considerado o mais importante. Para a tomada dessa decisão, foram levados em consideração dois fatores: a integridade estrutural da molécula do princípio ativo e a magnitude da sua degradação. Por se

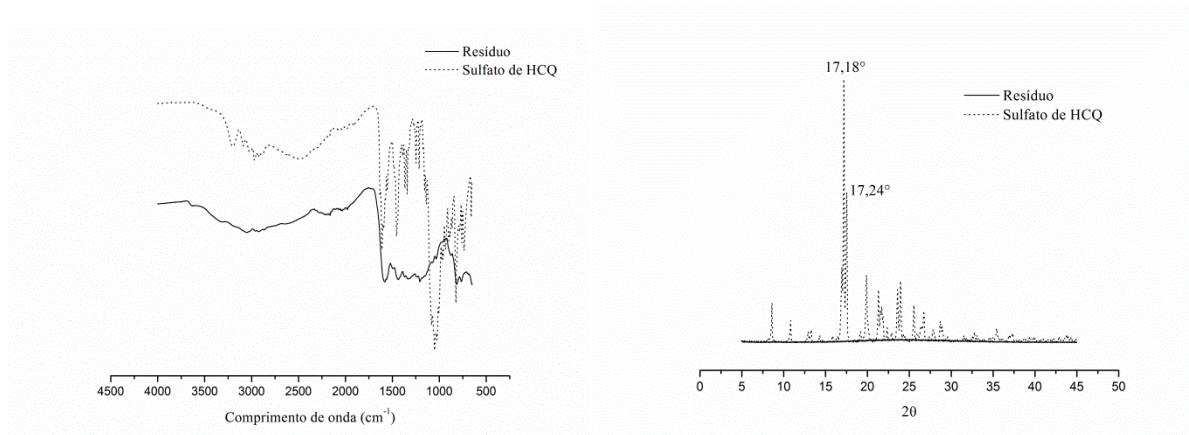
tratar de um fármaco, toda e qualquer alteração na sua estrutura química pode vir a causar problemas no que tange a farmacocinética e a farmacodinâmica da substância em questão quando essa for administrada. A degradação pode, por ventura, promover a formação de produtos de degradação e esses, por sua vez, serem tóxicos. Quanto à magnitude da degradação, considerou-se como significativa uma perda de massa de no mínimo 10%, na tentativa de transpor a informação preterida pelo ICH quando se refere ao estudo de degradação forçada de fármacos. Dessa forma, após o segundo evento, mais de 1g (> 20%) da massa inicial não se trata mais do fármaco íntegro, e sim, produtos voláteis ou de degradação com determinado potencial tóxico ou outra substância ora com nenhuma atividade, ora com ações de potenciação da resposta farmacológica (ICH, 2003).

A fim de investigar as alterações moleculares causadas pelas etapas degradativas, a amostra foi submetida à condição isoterma na temperatura de 300°C (T_{onset}) por durante 2 horas. Terminada a análise, o resíduo foi levado à caracterização através de FT-IR e DR-X para a observação dos grupos funcionais e do perfil difratométrico, respectivamente

A partir do espectro de infravermelho do resíduo analisado (Figura 28.a), foi possível evidenciar que, ao final do segundo evento, deixa de ser possível visualizar as bandas referentes às deformações axiais do grupo hidroxila e da amida pertencente ao anel heterocíclico ($3584 - 3650\text{ cm}^{-1}$ e $3310 - 3350\text{ cm}^{-1}$, respectivamente); bem como a banda resultante da interação da molécula de HCQ com o ânion sulfato e com as ligações de hidrogênio intermoleculares, que deveria ser observada na região entre $2250 - 2750\text{ cm}^{-1}$. Isso passa a descaracterizar a molécula, já que esta se trata de uma 4-aminoquinolina. Além disso, é possível verificar que as bandas referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas do sulfato e simétrica do cloro estão ausentes, indicando que as ligações intermoleculares são desfeitas e que a molécula perde seu átomo de cloro que está provavelmente relacionado ao mecanismo de reação do fármaco. A figura 28.b) ainda mostra o total desaparecimento de picos que caracterizam a cristalinidade da molécula, evidenciando um perfil amorfo e confirmando o fato de que no resíduo não há indícios da integridade do sulfato de HCQ.

Tendo em vista todas as informações citadas acima, concluiu-se que o segundo evento está intimamente relacionado com a degradação do sulfato de HCQ, uma vez que é possível observar os fenômenos mais impactantes no que tange a estabilidade da molécula e manutenção da sua vida útil.

Figura 28. Comparação entre o sulfato de hidroxicloroquina e o seu resíduo após ser submetido à condição isothermal na temperatura de 300°C: a) Espectro de infravermelho e b) Difração de raios-X.



A análise de DSC-fotovisual confirmou os resultados obtidos até então. A Figura 29.d) mostra o início da fusão do fármaco, estando em conformidade com a faixa prevista pelo presente estudo e com a literatura (USP 36 – NF 31, 2013). Através da técnica foi possível consolidar a afirmação de que o primeiro evento de degradação do sulfato de HCQ sobrepõe o evento relacionado à fusão do mesmo. A figura 29.k) mostra a mudança da coloração do material, sendo mais bem visualizada pela figura 29.l). A análise ainda evidenciou o evento de degradação conseguinte. Na figura 29.o), o material se apresenta com diferente coloração e aspecto. A coloração negra sugere a degradação do material, confirmada pela curva TG. Já a fluidificação sugere que tal degradação promove a perda da estrutura reticular do fármaco. Aqui pode também ser observada a volatilização do material degradado, caracterizada pela presença de bolhas (MACÊDO & NASCIMENTO, 2001; SILVA et al., 2009^b). Vale salientar que é essa a degradação tida como marjoritária, mais importante pela magnitude de perda de massa e modificação da estrutura do princípio ativo. Esta foi, portanto, o evento escolhido para o cálculo dos parâmetros cinéticos.

A pirólise também foi realizada a fim de corroborar as informações supracitadas. Para a análise da Pirólise-GC-MS, a temperatura de 300°C foi escolhida a fim de identificar os produtos de degradação correspondentes ao principal evento de perda de massa da molécula do sulfato de HCQ. O pirograma obtido (Figura 30) foi utilizado para identificar a fragmentação do fármaco decorrente da sua degradação térmica.

Figura 29. DSC-fotovisual do sulfato de hidroxicloroquina matéria-prima.

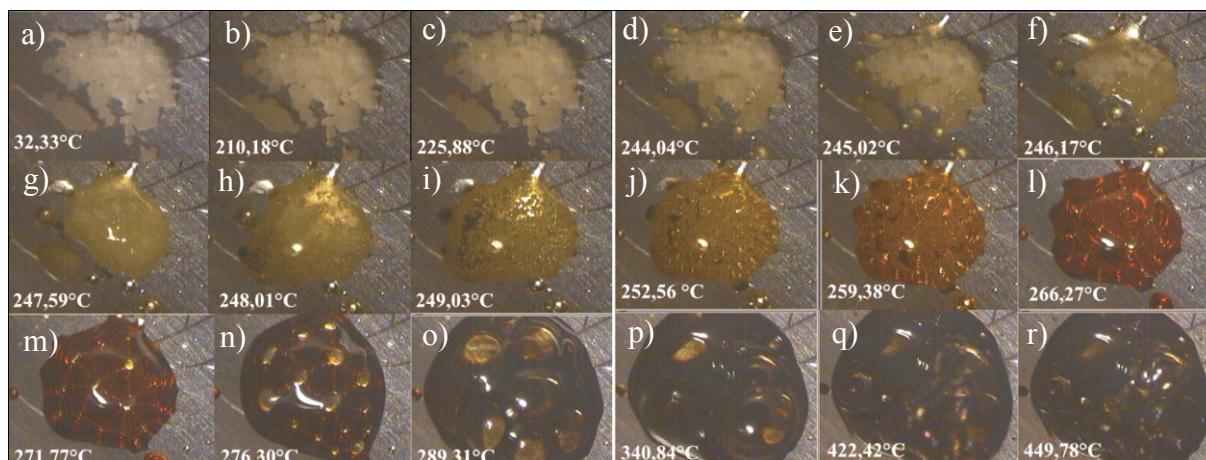
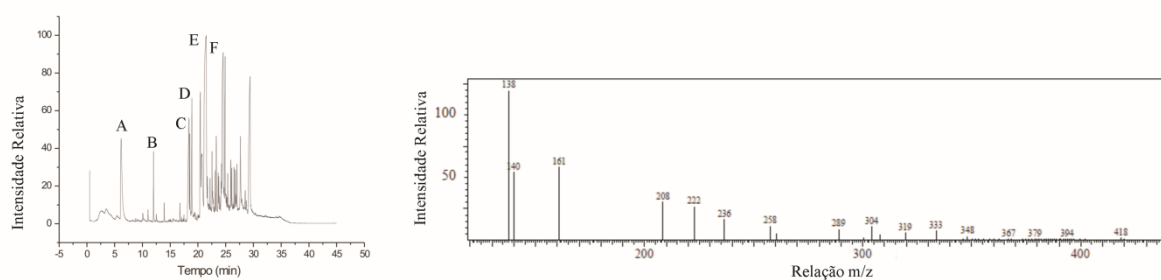


Figura 30. Pirograma do sulfato de HCQ (temperatura de 300°C)



A partir do EM dos principais produtos da pirólise, pode-se sugerir a presença de picos característicos da molécula e seus fragmentos. A Tabela 23 sumariza tais resultados, evidenciando: tempo de retenção, relação M/Z, nomenclatura e fórmula molecular e estrutural.

Tabela 23. Produtos de degradação térmica do sulfato de hidroxicloroquina obtidos através de pirólise-CG/MS.

Pico	Tempo de retenção (min)	Relação m/z	Nomenclatura	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
A	6,175	99	Ânion Sulfato	SO_4^{2-}	
B	12	163	2-Cloro-Quinolina	$\text{C}_9\text{H}_5\text{NCl}$	
C	18,4	178	6-Cloro-8-aminoquinolina	$\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_2$	
D	20,4	244	4-(5-metil-4,5-dihidropirrolid-1-il)-7-cloroquinolina	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}$ 2	
E	21,05	246	3-Cloro-4-t-butil-6-fenilpiridazina	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}$ 2	
F	24,9	291	2-(7-cloroquinolina-4-il)amino)-5-etilamino pentanto	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}$ 3	

A ausência do pico do íon molecular da HCQ base livre no EM (Figura 30) confirma que o evento de perda de massa observado na curva TG entre 288,55-301,16°C, corresponde à principal etapa degradativa do material, e que essa está intimamente relacionada com a integridade do insumo farmacêutico ativo. Logo, pode-se afirmar que, a partir de 301°C, não existe a presença de sulfato de HCQ intacto (OLIVEIRA et al., 2011; MOURA et al., 2010).

Além disso, a alta intensidade relativa dos picos corrobora essa informação, uma vez que esse fato evidencia que quase a totalidade da amostra encontra-se degradada.

A técnica se demonstrou elucidativa ao evidenciar que o segundo evento de perda de massa visto na curva TG do fármaco é, de fato, a principal etapa de degradação térmica do sulfato de HCQ. Além disso, no que diz respeito à identificação dos fragmentos da decomposição térmica, foi possível observar que os principais picos de degradação são provenientes da quebra da HCQ base livre no grupamento quinolina, junto a pontos instáveis da molécula sujeitos à quebra, o que fornece relevantes informações sobre a estabilidade térmica do insumo farmacêutico ativo.

A partir dos parâmetros cinéticos, é possível sugerir a estabilidade térmica de um material através de estudos cinéticos realizados sob condições não-isotérmicas e isotérmicas, através de diversos modelos matemáticos isoconversionais integrais e/ou diferenciados.

Os parâmetros cinéticos: Energia de ativação (E_a), fator de frequência (A) e a ordem da reação (n); podem fornecer informações sobre o mecanismo e a razão de decomposição da reação, condições de armazenamento e, especialmente, o prazo de validade (SOVIZI, 2010; TIȚA, et al., 2010; TIȚA, et al., 2008).

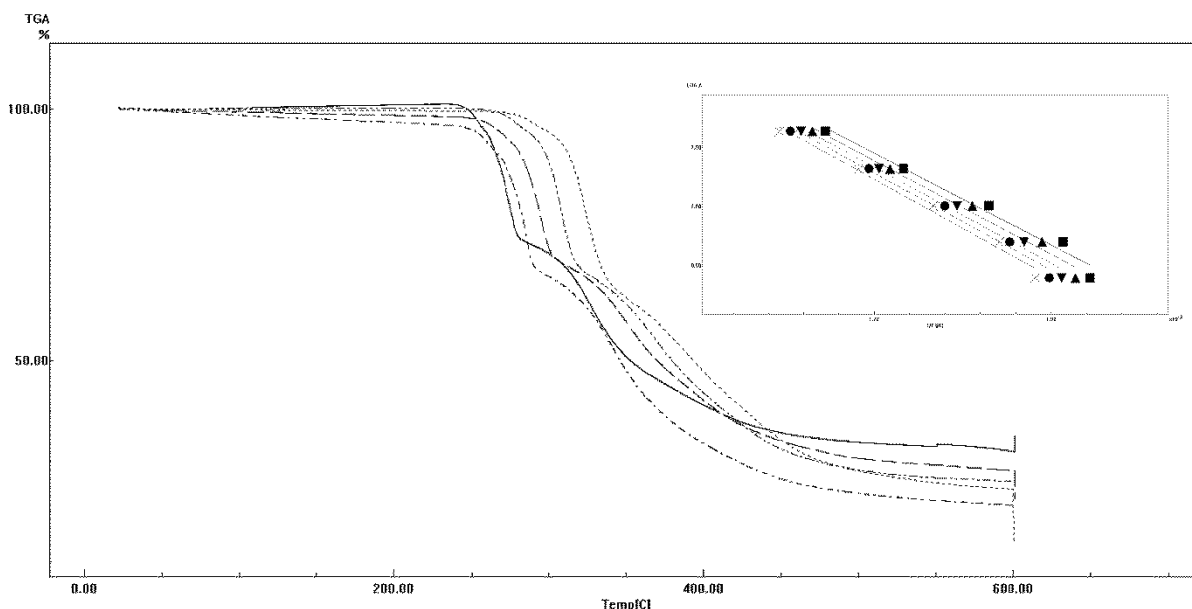
Para determinar os parâmetros cinéticos sob condições não-isotérmicas utilizou-se o método de Ozawa originado pela aproximação linear em relação ao cálculo integral da equação de Arrhenius. Os dados da cinética em condições não-isotérmicas foram determinados traçando a perda de massa em função da temperatura de cinco curvas TG em diferentes razões de aquecimento (2,5; 5; 10; 20 e 40 °C.min⁻¹), representado graficamente pelo plot de Friedman (KOGA, 2013; SOVIZI, 2010).

O método não-isotérmico estabelecido por Ozawa é frequentemente utilizado para determinar os parâmetros de Arrhenius em condições dinâmicas de razão de aquecimento. A E_a pode ser determinada a partir de um gráfico do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura, $1/T$, desde que $f(\alpha)$ (fração descomposta de um sólido em função da temperatura) seja previamente conhecida (ARAUJO, et al., 2005; CIDES, et al., 2006; FELIX, et al., 2009; SALVIO-NETO & MATOS, 2011; TIȚA, et al., 2010).

O gráfico que representa as curvas TG do sulfato de HCQ isolado em diferentes razões de aquecimento e o gráfico de Ozawa ($\ln$ da razão de aquecimento em função de $1/T$) está representado na Figura 31. Este demonstrou a evidente correlação entre as 5 razões de aquecimento, quando o segundo evento é analisado, uma vez que as retas têm coeficientes angulares (*slopes*) praticamente constantes e, portanto, formam retas paralelas, o que implica

em dizer que a E_a é constante durante todo o curso da reação, como mencionado por (TITA et al., 2010; KOGA, 2013).

Figura 31. Curvas TG do sulfato de hidroxicloroquina obtidas a partir de razões de aquecimento crescentes (2,5, 5, 10, 20 e 40°C/min) e associação com o gráfico de Ozawa.



A partir da plotagem do gráfico $G(x)$ em função do *Tempo Reduzido* (min) (Figura 32) pôde-se escolher o melhor mecanismo de reação para o cálculo cinético do segundo evento. Essa representação gráfica promove a formação de uma linha reta e, assim, o melhor modelo reacional pode ser escolhido através de tratamento estatístico de modelo de regressão linear. Nesse caso, o segundo evento de degradação foi caracterizado como reação de primeira ordem ($n=1$) por apresentar $r^2=0,998$; mais significativo que aqueles obtidos para $n=0$ e $n=2$. Os demais parâmetros cinéticos foram mensurados a partir da escolha do melhor modelo reacional. A E_a calculada pelo método de Ozawa apresentou um valor de $144,57 \text{ KJ/mol}^{-1}$ e fator de frequência (A) de $4,910 \times 10^{12} \text{ min}^{-1}$. O restante dos valores obtidos para os demais eventos degradativos estão sumarizadas na tabela 24.

Figura 32. Plotagem do gráfico $G(x)$ vs. *Tempo Reduzido* (min) para uma reação de 1ª ordem e os valores de energia de ativação (E_a) e fator de frequência (A).

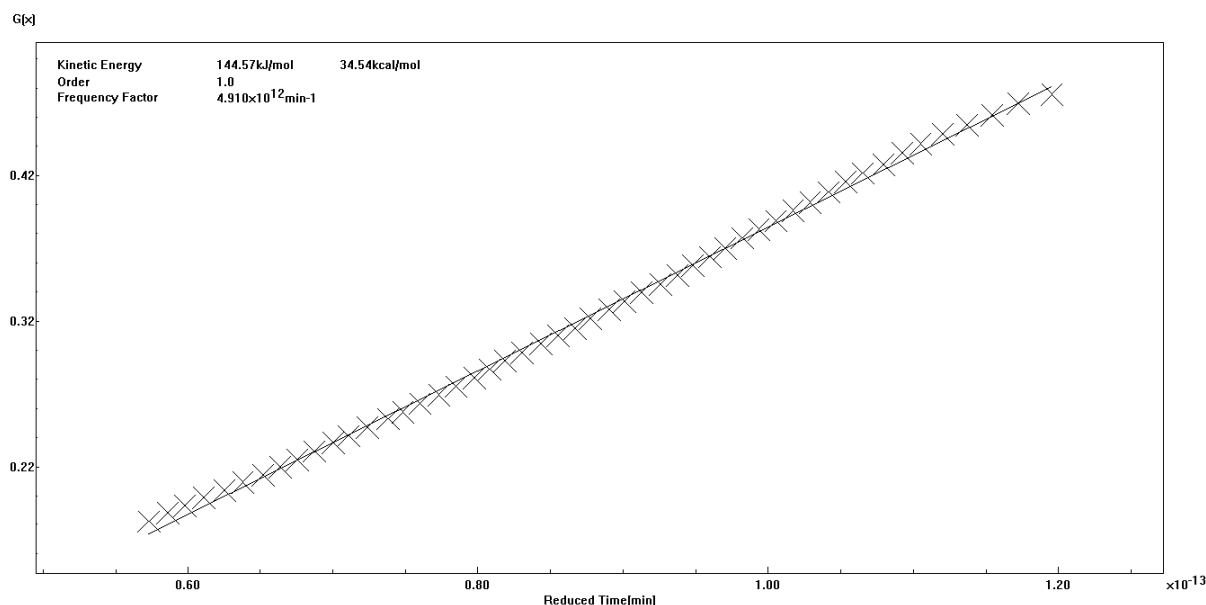


Tabela 24. Valores dos r^2 obtidos para a regressão linear de cada ordem de reação (0, 1 e 2) para cada etapa degradativa e seus respectivos valores dos parâmetros cinéticos.

Ordem da Reação (n)	Evento	r^2	E_a (KJ.mol ⁻¹)	A (min ⁻¹)
0	1ª Evento	0,99671	144,57	$3,755 \times 10^{-12}$
	2ª Evento	0,99692	144,57	$5,021 \times 10^{-12}$
	3ª Evento	0,99389	144,57	$6,965 \times 10^{-12}$
1	1ª Evento	0,99701	144,57	$3,672 \times 10^{-12}$
	2ª Evento	0,99718	144,57	$4,910 \times 10^{-12}$
	3ª Evento	0,99395	144,57	$6,811 \times 10^{-12}$
2	1ª Evento	0,89236	161,74	$2,343 \times 10^{-12}$
	2ª Evento	0,95319	161,74	$6,424 \times 10^{-12}$
	3ª Evento	0,99804	161,74	$4,103 \times 10^{-13}$

Definida a ordem de reação como de 1ª ordem, pôde-se sugerir que a velocidade da reação de degradação do segundo evento é determinada pela concentração de um de seus reagentes. Graficamente, os resultados são representados pelo logaritmo neperiano da concentração ($\ln C$) em função do tempo (t). É possível eliminar a possibilidade de se tratar de uma reação de pseudo-primeira ordem uma vez que a cinética de degradação está sendo avaliada no fármaco em forma sólida, não em solução. Reações de pseudo-primeira ordem são

características de soluções aquosas ou tamponadas contendo fármacos, isso porque a quantidade dos reagentes que exerce a influência é tamanha (água ou íons H^+) que a sua concentração é negligenciável (FLORENCE & ATTWOOD, 2011; NUDELMAN, 1975)

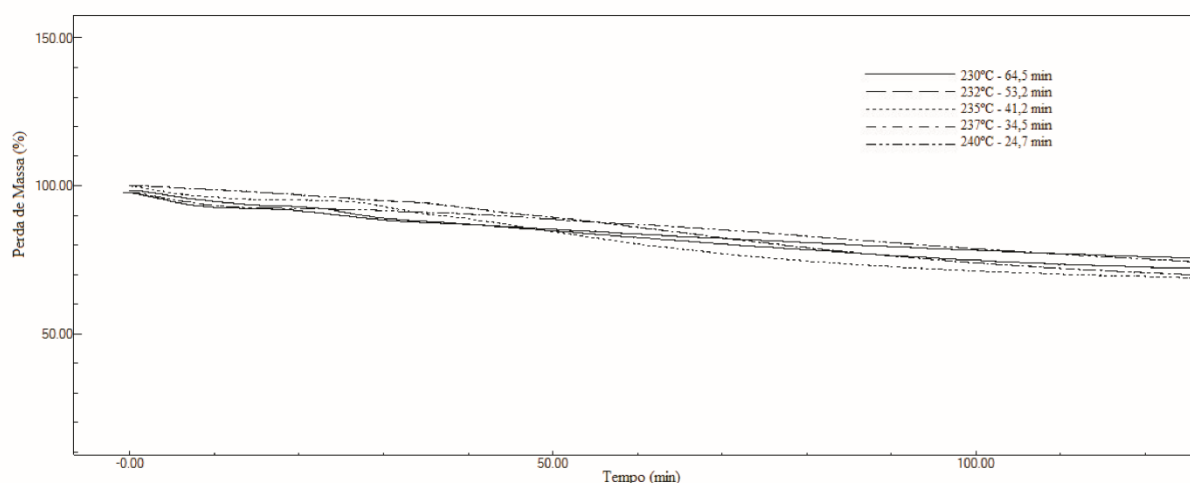
O método isotérmico utiliza a mesma razão de aquecimento, porém as temperaturas são mantidas constantes na região de interesse (antes do início do processo de decomposição) para observar a cinética da reação de decomposição isotérmica no estado sólido do material. Portanto, o tempo de decomposição é estimado para um determinado intervalo de perda de massa, 10% conforme adaptações às diretrizes do ICH (ALVES et al., 2010; ICH, 2003).

A figura 33 esquematiza os dados obtidos das isotermas utilizadas para determinar a energia de ativação do sulfato de HCQ sob condições isotérmicas. Através do método das tangentes as seguintes temperaturas de isoterma foram selecionadas: 230, 232, 235, 237 e 240°C; todas elas prévias as degradações do fármaco (1º evento de degradação). Para assegurar que não houvesse uma súbita degradação do fármaco e reduzir o tempo do experimento – visando redução de custos e otimização do tempo –, uma rampa de aquecimento foi utilizada (Tabela 25). As temperaturas foram mantidas constantes, sob uma atmosfera controlada de nitrogênio (100 mL.min⁻¹), durante o tempo suficiente para uma perda de massa de pelo menos 10%. Como esperado, quanto maior foi temperatura, mais curto foi tempo necessário para a significativa perda de massa.

Tabela 25. Rampa de aquecimento utilizada para obtenção temperaturas isotérmicas constantes.

Razão de Aquecimento (β) (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
20	180	-
5	Temperatura de Isoterma – 20°C	-
2	Temperaturas de Isoterma	120

Figura 33. Curvas isotérmicas do sulfato de hidroxicloroquina em diferentes temperaturas mantidas constantes em atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).



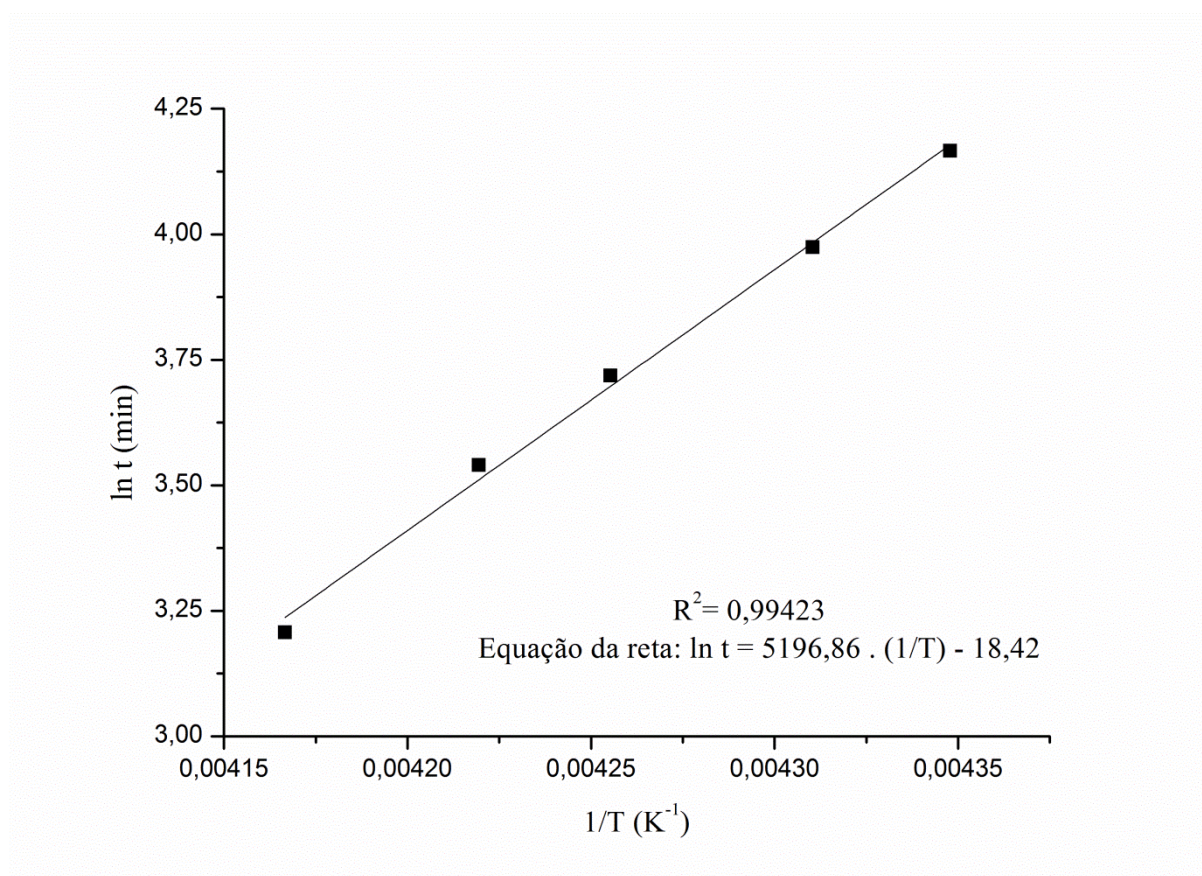
As mesmas curvas isotermas foram utilizadas para realizar os cálculos para determinação da ordem de reação utilizando o modelo de Arrhenius. Os dados foram plotados e estão representados na Tabela 26. A escolha da ordem de reação se baseou no modelo estatístico de regressão linear, através dos valores de coeficiente de correlação, cujo tem maior significância quanto mais próximo de 1 (um) ele for. Viu-se que a cinética de degradação do sulfato de HCQ, quando em condições isotérmicas, segue ordem de reação 1 ($r=0,963$), semelhante ao apresentado nas condições não-isotérmicas. A corroboração dos resultados fornece uma maior confiabilidade sobre a real aplicação dos métodos cinéticos sobre o material (PEREIRA, 2013).

Tabela 26. Determinação da ordem de reação da cinética de degradação do sulfato de hidroxicloroquina sobre condições isotérmicas

Temperatura (°C)	Coeficiente de de Correlação		
	n=0	n=1	n=2
230	0,991	0,987	0,962
232	0,973	0,982	0,980
235	0,981	0,986	0,987
237	0,900	0,910	0,917
240	0,937	0,951	0,962
Média	0,956	0,963	0,962

Portanto, baseando-se na equação de Arrhenius obtida por intermédio do respectivo gráfico, pôde-se estimar a estabilidade, em dias, do sulfato de HCQ quando mantido sob temperatura ambiente (25°C), resultando em um prazo de validade estimado em, aproximadamente, 622 dias (20 meses). O valor obtido – apesar de menor – mostra certa correlação com o prazo de validade estabelecido pelo estudo de estabilidade convencional.

Figura 34. Gráfico de Arrhenius ($\ln t$ vs. $1/T$) para a decomposição térmica do sulfato de hidroxyclorequina matéria-prima.



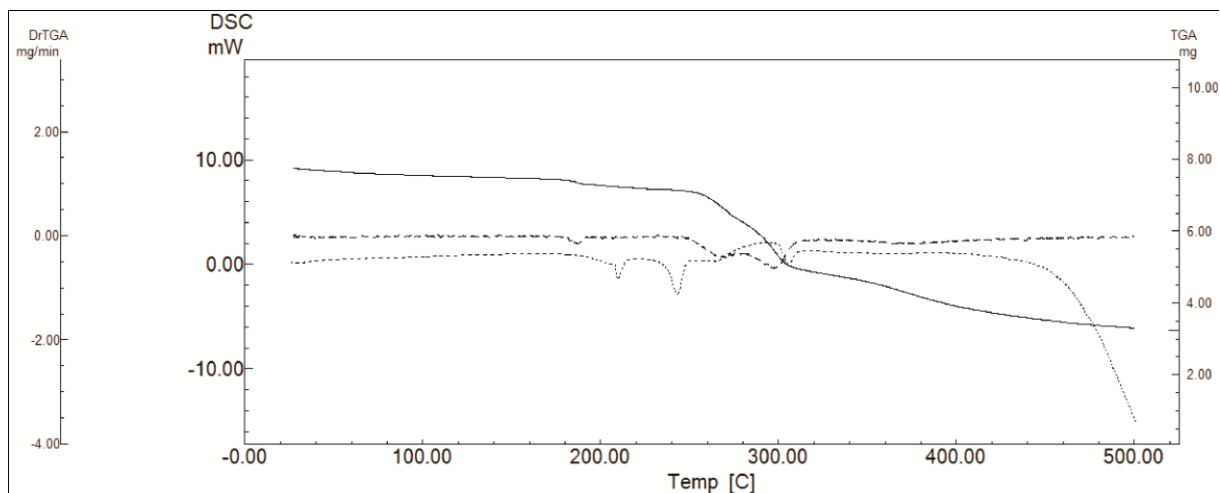
5.4.2 Estudo do comportamento térmico do comprimido à base de sulfato de hidroxyclorequina

A curva TG do comprimido do sulfato de HCQ está apresentada na figura 35. Diferente do observado no comportamento térmico da matéria-prima, um novo evento foi evidenciado, com início em 182,68°C e término em 189,24°C, resultando numa discreta perda de massa de 1,62% da massa inicial ($DTG_{pico}=185,64$). Esse comportamento parece ser característico da lactose e é mais bem visualizado a partir da curva DSC. O segundo evento, concomitante ao final do evento relativo à fusão do fármaco – característica semelhante ao

observado na matéria-prima –, com início em 258,17°C término em 269,93°C, resultou em uma perda de massa de 8,92% da massa inicial ($DTG_{pico}=264,28$). Foi evidenciado que tal evento de degradação foi antecipado, havendo um aumento significativo da perda de massa em relação à matéria-prima isolada, sugerindo uma possível interação entre o fármaco e pelo menos um dos excipientes presentes no comprimido. Os demais eventos demonstraram-se semelhantes às faixas de temperatura obtidas quando a matéria-prima foi analisada. Em contrapartida, esses evidenciaram uma relativa proteção do fármaco, uma vez que a perda de massa em ambos os eventos é menor. Assim, pode-se sugerir que houve uma interação fármaco-excipiente positiva. O terceiro evento, na faixa de temperatura compreendida entre 290,09-304,35°C, apresentou uma perda de massa de 15,57% ($DTG_{pico}=295,40$). O quarto, bem discreto, é observado entre 359,15-395,92°C, correspondendo a uma perda de massa de 10,49% ($DTG_{pico}=373,40$).

A curva DSC do comprimido do sulfato de HCQ apresentou o total de 4 picos (Figura 35). Sugere-se que o primeiro evento corresponde a um dos excipientes presentes na forma farmacêutica, uma vez que esta etapa não é visualizada na curva DSC da matéria-prima isolada. Tal perfil apresentado de perda de massa seguida de um evento de fusão é característico da lactose (desidratação seguida de sua fusão). Na curva DSC do comprimido, ele é bem definido e de baixa amplitude, na faixa de temperatura: 207,77-213,57°C ($\Delta H=33,89 \text{ J.g}^{-1}$). O segundo pico, relativo à fusão do fármaco, tem amplitude e intensidade significativamente menores que o pico apresentado pelo fármaco isolado, mas ele é observado praticamente na mesma faixa de temperatura, entre 237,33-252,24°C. Em contrapartida, a fusão do fármaco na curva DSC do comprimido apresenta variação de entalpia bem menor ($\Delta H=57,93 \text{ J.g}^{-1}$) comparada ao fármaco isolado. Fica claro que há certa influência exercida pela lactose sobre o sulfato de HCQ (MACEDO et al., 2000). O terceiro evento, de baixa amplitude, observado entre 248,20-274,90 ($\Delta H=11,81 \text{ J.g}^{-1}$) mostra claramente que o material precisa liberar certa quantidade de energia para, só assim, haver a degradação que antecede a calcinação do material, no evento 4º evento, compreendido entre 300,86-309,97°C ($\Delta H=26,87 \text{ J.g}^{-1}$). Todos os eventos vistos no comprimido foram também visualizados na matéria-prima, no entanto, todos apresentaram menor E_a , o que pode indicar a existência de interação fármaco-excipiente.

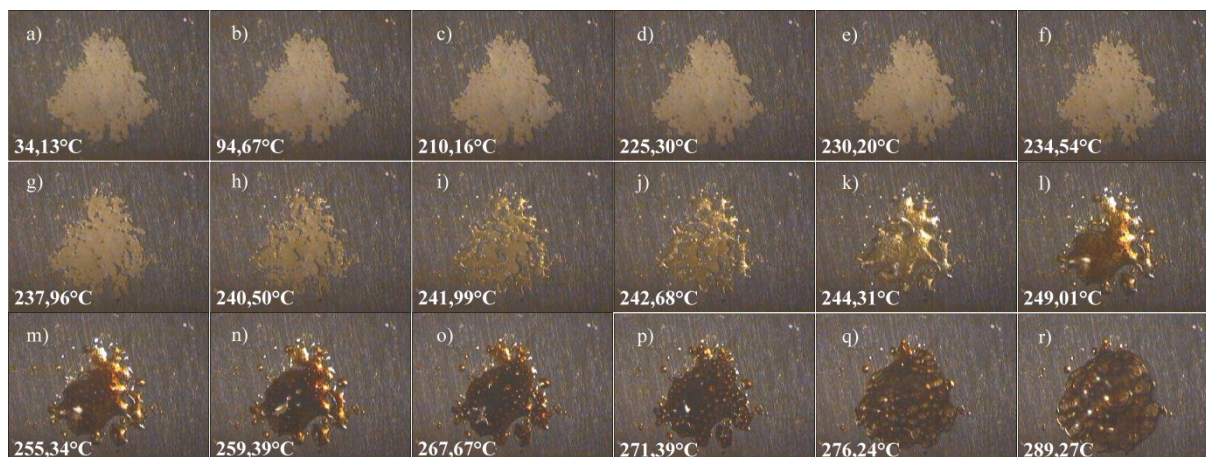
Figura 35. Curva DSC, TG e DTG do sulfato de hidroxiclороquina ($\beta=10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$)



O DSC-fotovisual do comprimido Plaquinol[®] (Figura 36) sugeriu a existência de uma interação fármaco-excipiente entre o sulfato de HCQ e os excipientes utilizados na forma farmacêutica sólida. A perda de massa seguida de fusão da lactose (207,77-213,57°C), bastante discreta, não pôde ser evidenciada. No entanto, os eventos de fusão seguido da degradação do sulfato de HCQ puderam ser visualizados e se mantiveram bastantes semelhantes ao observado para o fármaco isolado (fig X.g-k), representados pelos primeiros sinais de fluidificação da amostra seguidos de mudança da coloração branca para amarela. O evento relativo à principal degradação do fármaco, compreendida entre 248,20-274,90°C (fig X.l-q), apresentou-se menor que a faixa observada para o fármaco isolado, caracterizando um forte indício de que, pelo menos um dos excipientes da formulação, está exercendo uma interação negativa sobre o fármaco. Isto pôde ser visualizado pela mudança da coloração amarela para castanho-escuro e, em seguida, negra. Entretanto, através da imagem, pôde-se perceber a ausência de bolhas nesta faixa de temperatura. Este comportamento sugere a redução da volatilização de material e consequente redução da perda de massa da amostra, o que pôde ser confirmado a partir da curva TG/DTG, visto que o material foi analisado em proporção estequiométrica à presença de fármaco na formulação. O último evento de perda de massa não pôde ser visualizado na análise, mas já é possível observar a ocorrência de bolhas a partir da Figura X.r), proveniente da degradação compreendida entre 300,86-309,97°C, também mostrando-se antecipado em relação ao mesmo evento observado no fármaco isolado. Em suma, os resultados obtidos a partir desta análise sugerem uma possível interação fármaco-excipiente negativa. Entretanto, a significativa redução da perda de massa de todos os eventos apresentados pela curva TG/DTG sugerem o incremento da estabilidade térmica do

material, mesmo que estes tenham ocorridos em faixas de temperatura inferiores às aquelas observadas no fármaco isolado. Assim, os resultados experimentais obtidos através do estudo cinética da degradação com consequente estimativa do prazo de validade, pôde confirmar a hipótese aqui mencionada.

Figura 36. DSC-fotovisual do comprimido Plaquinol[®] à base do sulfato de hidroxicloroquina.



5.4.3 Estudo da cinética de decomposição do sulfato de hidroxicloroquina comprimido à base de sulfato de hidroxicloroquina

Assim como na matéria-prima, o gráfico que representam as curvas TG do sulfato de HCQ comprimido em diferentes razões de aquecimento e o gráfico de Ozawa demonstrou evidente correlação entre as 5 razões de aquecimento, evidenciado pelos valores constantes dos coeficientes angulares. Nesse caso, o terceiro evento foi analisado, uma vez que esse diz respeito ao segundo evento evidenciado pelas curvas TG da matéria-prima que, por sua vez, corresponde à degradação do fármaco mais significativa.

Essas informações caracterizam método dinâmico como uma forma confiável de obtenção do cálculo da cinética de degradação e, por consequência, do prazo de validade estimado. Isso quer dizer que, apesar da associação do fármaco com os demais adjuvantes farmacêuticos, não houve aparecimento significativo de reações paralelas, cruzadas e/ou complexas; capaz de alterar os valores dos *slopes* das curvas obtidas (TITA et al., 2011; KOGA, 2013).

A partir da plotagem do gráfico $G(x)$ em função do *Tempo Reduzido* (min) (Figura 37) foi possível definir o terceiro evento de degradação (correspondente à degradação do

fármaco) como de reação de segunda ordem ($n=2$) por apresentar $r^2=0,995$; mais significativo que aqueles obtidos para n entre 0 e 5. A diferença entre as ordens de reação (1ª ordem para o fármaco) reside na natureza da amostra, agora, uma mistura de pós de fármaco e excipientes, onde a curva TG corresponde ao somatório dos eventos de cada um dos componentes da formulação. Logo, é notório que a cinética reacional não depende apenas de um analito. Os demais parâmetros cinéticos foram mensurados a partir de escolha de $n=2$, sendo a $Ea=128,69 \text{ KJ/mol}^{-1}$ e $A=2.211 \times 10^{11} \text{ min}^{-1}$. Os demais valores obtidos para as demais etapas degradativas estão sumarizadas na tabela 27.

Figura 37. Plotagem do gráfico $G(x)$ vs. *Tempo Reduzido* (min) para uma reação de 1ª ordem e os valores de energia de ativação (Ea) e fator de frequência (A).

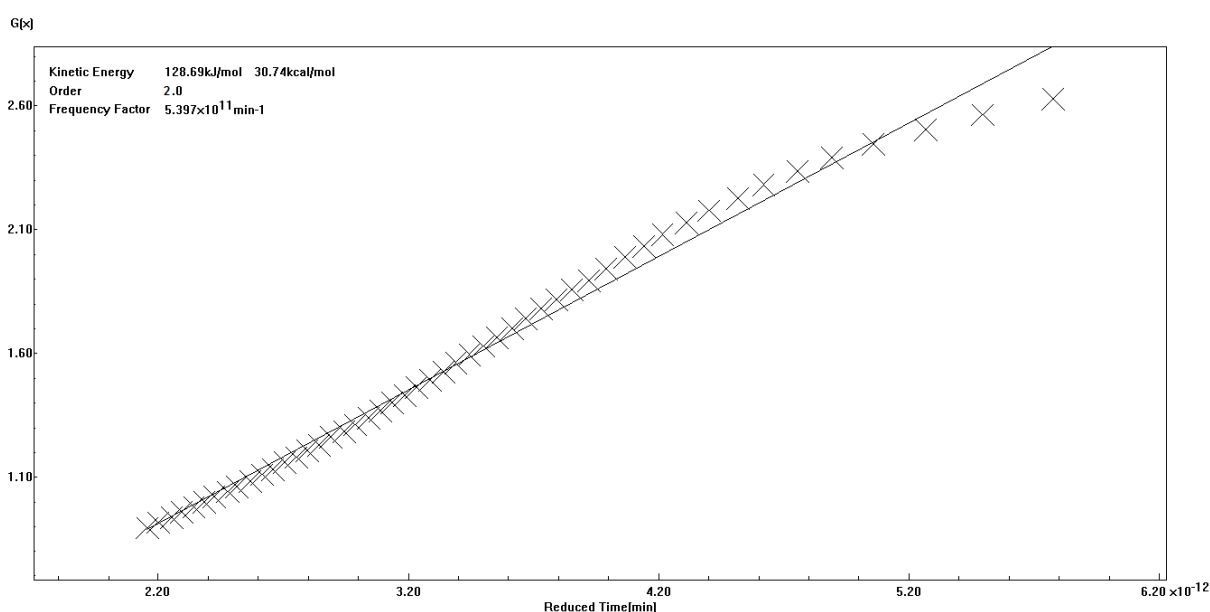


Tabela 27. Valores dos r^2 obtidos para a regressão linear de cada ordem de reação (0, 1, 2, 3, 4 e 5) para o segundo evento de degradação e seus respectivos valores dos parâmetros cinéticos.

Ordem da Reação (n)	r^2	$Ea \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$	$A \text{ (min}^{-1}\text{)}$
0	0,978	128,69	4.064×10^{10}
1	0,989	128,69	1.157×10^{11}
2	0,995	128,69	2.211×10^{11}
3	0,987	128,69	4.286×10^{11}
4	0,985	128,69	8.320×10^{11}
5	0,989	128,69	1.1624×10^{12}

A figura 38 sumariza os dados obtidos das isotermas utilizadas para determinar a energia de ativação do sulfato de HCQ no comprimido sob condições isotérmicas. Através do método das tangentes as seguintes temperaturas de isoterma foram selecionadas: 246, 248, 250, 252 e 254°C; todas elas prévias as degradações do fármaco (3º evento de degradação). A rampa de aquecimento utilizada no estudo cinético de degradação da matéria-prima foi repetida com a mesma metodologia e mesmos fins. As temperaturas foram mantidas constantes, sob uma atmosfera controlada de nitrogênio (100 mL.min^{-1}), durante o tempo suficiente para uma perda de massa de pelo menos 10%.

Como esperado, quanto maior foi temperatura, mais curto foi tempo necessário para a significativa perda de massa. A partir da equação de Arrhenius obtida por intermédio do respectivo gráfico (Figura 39), pode-se estimar a estabilidade em dias do HCQ na forma farmacêutica quando mantido sob temperatura ambiente (25°C), resultando em um prazo de validade estimado em, aproximadamente, 790 dias (26 meses). Tal resultado mostra que há uma significativa proteção do fármaco, sugerindo que os a forma farmacêutica, mais precisamente, os adjuvantes farmacêuticos, fornecem maior estabilidade para o insumo farmacêutico ativo, uma vez que é requerida mais tempo para que a mesma porcentagem de fármaco decaia.

Figura 38. Curvas isotérmicas do sulfato de hidroxicloroquina na forma farmacêutica comprimido em diferentes temperaturas mantidas constantes em atmosfera de nitrogênio (100 mL.min^{-1}).

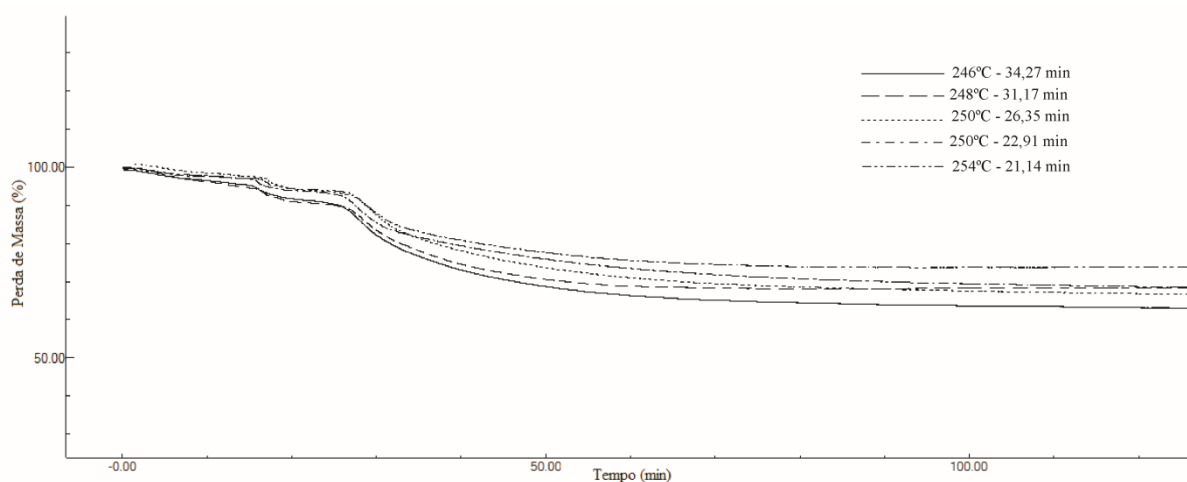
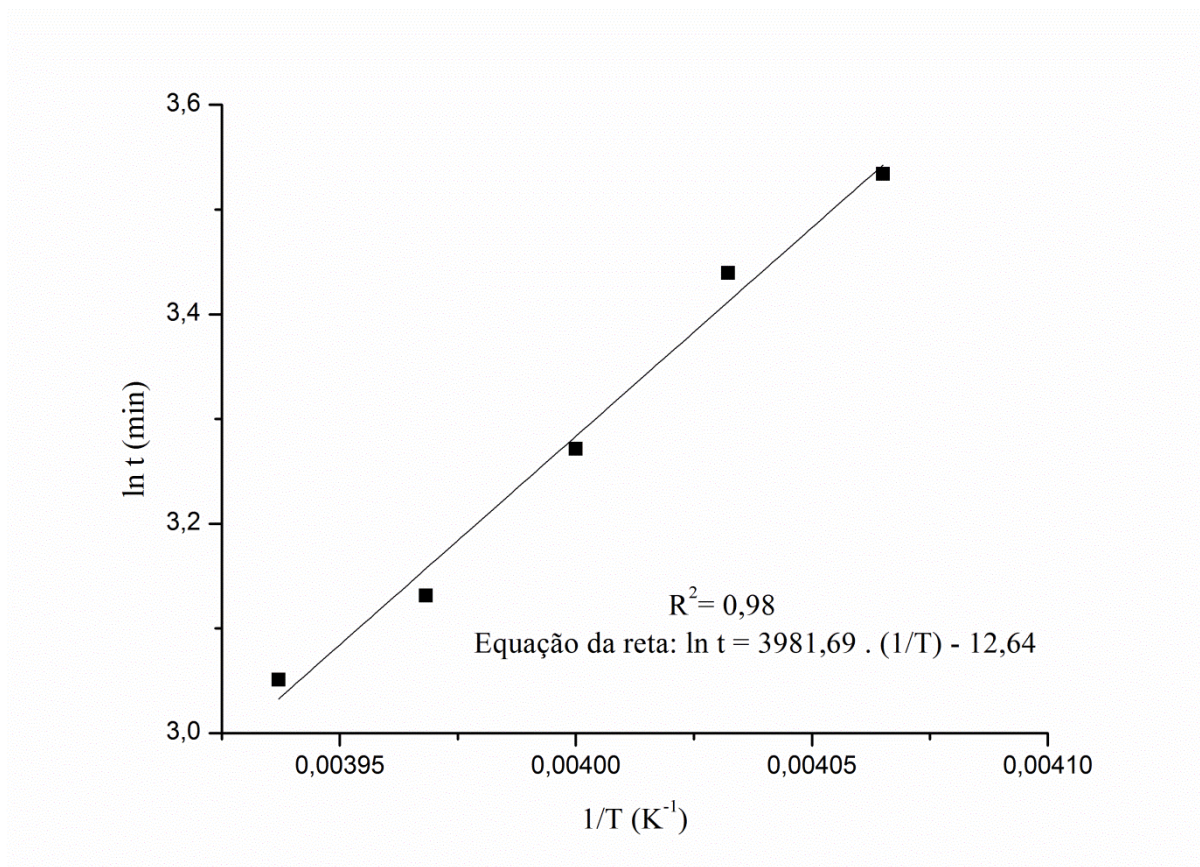


Figura 39. Gráfico de Arrhenius ($\ln t$ vs. $1/T$) para a decomposição térmica do sulfato de hidroxicloroquina na forma farmacêutica.



5.4 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA ATRAVÉS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

As alterações dos valores obtidos a partir das curvas DSC correspondentes às MB, tais como alargamento e deslocamento de evento endotérmico de fusão e entalpia, não apontam necessariamente a ocorrência de incompatibilidades, mas demonstram interações entre os componentes em função do aquecimento. A curva DSC da MB entre o sulfato de HCQ e o polímero PVP elucida bem tal situação. É possível perceber um acentuado alargamento e redução do pico de fusão provocado por uma solubilização parcial do fármaco durante o aquecimento do polímero, evento descrito anteriormente por Oliveira (2011), Lima (2011) e Costa (2013) e colaboradores.

Com relação às MB, todas elas apresentaram diminuição significativa da entalpia envolvida no processo quando comparado à entalpia de fusão do sulfato de HCQ isolado. Entretanto, em apenas duas delas foi observado possível indício de interação: GAS e LA. Todas as demais MB apresentaram variações na faixa de fusão do sulfato de HCQ isolado de menos de $2^{\circ}C$ (Tabela 28). Já o GAS e a LA apresentaram os valores de $245,47^{\circ}C$ e $220,03^{\circ}C$,

respectivamente; caracterizando possíveis indícios de interação fármaco:excipiente. Estes, portanto, foram objetos de análises complementares.

Tabela 28. Temperatura inicial (T_{onset}), temperatura do pico (T_{pico}) e temperatura final (T_{endset}) do evento de fusão, variação da entalpia (ΔH), Temperatura de degradação (T_{deg}) e perda de Massa do sulfato de HCQ e das MB.

	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)	T_{deg} (°C)	Perda de Massa (%)
Sulfato de HCQ	242,23	254,90	244,83	185,85	301,12	30,9
MB						
Talco	241,91	249,75	246,03	58,21	301,54	16,52
PVP K30	-	-	-	-	297,92	16,70
Polyox [®]	233,80	247,83	243,02	44,70	300,83	15,92
PEG* 6000	236,99	248,55	243,88	99,73	301,34	10,13
Methocel [®]	239,72	250,05	245,69	62,94	295,32	12,23
Lactose*	210,48	235,53	234,43	26,67	210,65	15,82
Glicolato de amido sódico*	225,63	244,81	240,09	39,44	292,27	37,14
Estearato de Magnésio	237,56	248,54	244,02	59,13	304,37	18,10
Croscarmellose Sódica	241,08	250,73	246,03	68,22	297,10	30,18
Celulose Microcristalina	240,35	249,27	244,75	53,99	304,21	32,87
Starch [®]	241,73	250,91	246,39	60,63	317,52	25,39

A MB sulfato de HCQ:GAS apresentou comportamento térmico diferente do observado para o fármaco isolado. A curva TG apontou a presença de apenas 2 eventos térmicos. O primeiro – semelhante ao da curva TG do fármaco isolado, embora mais longo – teve início em 262,21°C e término em 287,04°C, com perda de massa de 5,33% ($DTG_{\text{pico}}=264,82^{\circ}\text{C}$). Em contrapartida, o segundo evento demonstrou-se bastante diferente ao sobrepor os dois eventos conseguintes existentes quando o fármaco isolado foi analisado. Na MB, o segundo evento, compreendido entre 281,67°C e 304,13°C apresentou uma única e clara etapa de perda de massa de 35,84% da massa inicial ($DTG_{\text{pico}}=292,71$). Além disso, a amostra apresentou significativa perda de massa (aproximadamente 5,4%), provavelmente relacionada à água adsorvida e estrutural, na faixa de 35-105°C; fenômeno que não foi

observado na curva TG do sulfato de HCQ isolado, sugerindo que houve aumento da higroscopicidade do material e consequente aumento da adsorção de água.

Quanto à curva DSC, há um evento endotérmico entre 121,93 e 176,82°C, relativo a uma desidratação da MB. O evento relacionado à fusão do sulfato de HCQ, por exemplo, foi bastante antecipado, formando um pico mais largo e de menor intensidade, observado entre 233,10-254,10°C. O segundo pico corresponde à degradação do fármaco conseguinte a sua fusão, compreendido na faixa de 258,57-274,55°C. O terceiro pico, diferente de todos os outros analisados, seja do fármaco ou da MB, apresentou natureza exotérmica. O pico é de baixa amplitude e pouco intenso, compreendido entre 292,84-306,35°C. Sugere-se que essa inversão da natureza esteja relacionada à degradação da interação fármaco:excipiente, o que aumenta a suspeita de incompatibilidade entre os componentes. Vale salientar que Rodrigues e colaboradores (2008) já evidenciaram essa possível interação entre o GAS e um análogo da hidroxicloroquina, a primaquina, o que fornece maiores subsídios para confirmar a possível incompatibilidade entre os materiais.

A MB do sulfato de HCQ:LA também apresentou comportamento térmico diferente do perfil evidenciado pelo fármaco isolado. Foi observada a antecipação do início da degradação do sulfato de HCQ, sugerindo possível redução da estabilidade do fármaco. No DTG, o evento de degradação da amostra evidencia um alargamento bastante pronunciado que pode ser explicado pela sobreposição de três eventos presentes nas curvas de TG/DTG das substâncias isoladas: degradação do sulfato de HCQ e a transição cristalina da lactose seguida de sua fusão. O primeiro evento encontra-se na faixa de 146,80-153,76°C ($DTG_{pico}=148,98^{\circ}C$), apresentando perda de massa de, aproximadamente, 1,6%, sugerindo perda de água de cristalização. O segundo evento, na faixa de 220,08-231,33°C ($DTG_{pico}=225,43^{\circ}C$), apresentou perda de massa de 16,18%, referente à degradação do fármaco. O terceiro, por sua vez, entre 285,25-310,85°C ($DTG_{pico}=295,02^{\circ}C$), demonstrou perda de massa de 16,59%; sendo a etapa que representa a etapa degradativa da lactose fundida. Estes resultados também foram observados em outros tipos de fármacos que possuem grupo aminas e amida, como a primaquina, análogo do HCQ (NAVARRO, 2001; ALVES, 2007; COSTA et al., 2013).

Com relação à curva DSA da MB contendo LA, foi observado o aparecimento de um pico estreito e intenso de natureza endotérmica seguido de um pico de pouca intensidade e de natureza exotérmica, entre 146,79-161,29°C, referente à perda de água de cristalização, fenômeno característico do perfil térmico do excipiente (COSTA et al., 2013). O segundo pico, entre 210,48-235,53°C, bastante intenso e largo, corresponde ao evento de fusão do

fármaco. Os outros dois eventos, ambos de natureza endotérmica, correspondem à degradação do fármaco. Entretanto, ao antecipar a fusão deste, o pico relativo à fusão e consequente degradação do sulfato de HCQ deixou de ser sobreposto. O fato de a MB sulfato de HCQ:LA ter apresentado, na curva DSC, perfil térmico completamente diferente pode indicar que há realmente incompatibilidade fármaco:excipiente. Os últimos dois eventos de perda de massa estão situados nas faixas de 253,98-284,12°C e 287,77-309,10°C.

Com exceção da lactose, todos os demais excipientes prolongaram o principal evento de decomposição térmica do sulfato de HCQ, podendo ser considerados possíveis componentes de formulações farmacêuticas termicamente estáveis.

A partir da determinação dos parâmetros cinéticos pôde-se confirmar a hipótese de que houve interação entre as MB: fármaco-GAS e fármaco-LA. A E_a é um dos parâmetros de maior interesse para avaliar a estabilidade de compostos farmacêuticos. Segundo Macedo e colaboradores (2000), é possível traçar um perfil comparativo de estabilidade térmica entre o insumo farmacêutico ativo e seus derivados apenas levando em consideração o valor da E_a . Os resultados evidenciaram a redução do valor da E_a , mostrando menor estabilidade térmica do sulfato de HCQ quando este está associado ao GAS sódico e à LA.

O prazo de validade das MB na forma sólida foi estimado a partir de modelo isothermal. A metodologia de escolha das temperaturas da isoterma e a utilização da rampa de aquecimento foram as mesmas utilizadas para o fármaco isolado, variando apenas as temperaturas da isoterma propriamente ditas. Assim, as temperaturas de isoterma da MB sulfato de HCQ-GAS foram: 252, 254, 256, 258 e 260°C (uma vez que a temperatura de degradação foi observada em 264°C). Já para a MB sulfato de HCQ-LA, as temperaturas foram: 195, 197, 199, 201 e 203°C (temperatura de degradação 210°C).

Os resultados demonstraram a considerável redução do tempo necessário para que a amostra perdesse 10% de sua massa inicial em temperatura ambiente, em relação ao prazo de validade estimado para o fármaco isolado. Apesar da pequena variação vista para a E_a apresentada pela MB HCQ-GAS, sugere-se que a grande porcentagem de perda de massa seja o fator responsável pelo grande decréscimo do prazo de validade (PEREIRA et al., 2013).

Tabela 29. Resultados obtidos para os cálculos dos parâmetros cinéticos do sulfato de hidroxiclороquina isolado e das misturas binárias entre o fármaco e o glicolato de amido sódico a lactose.

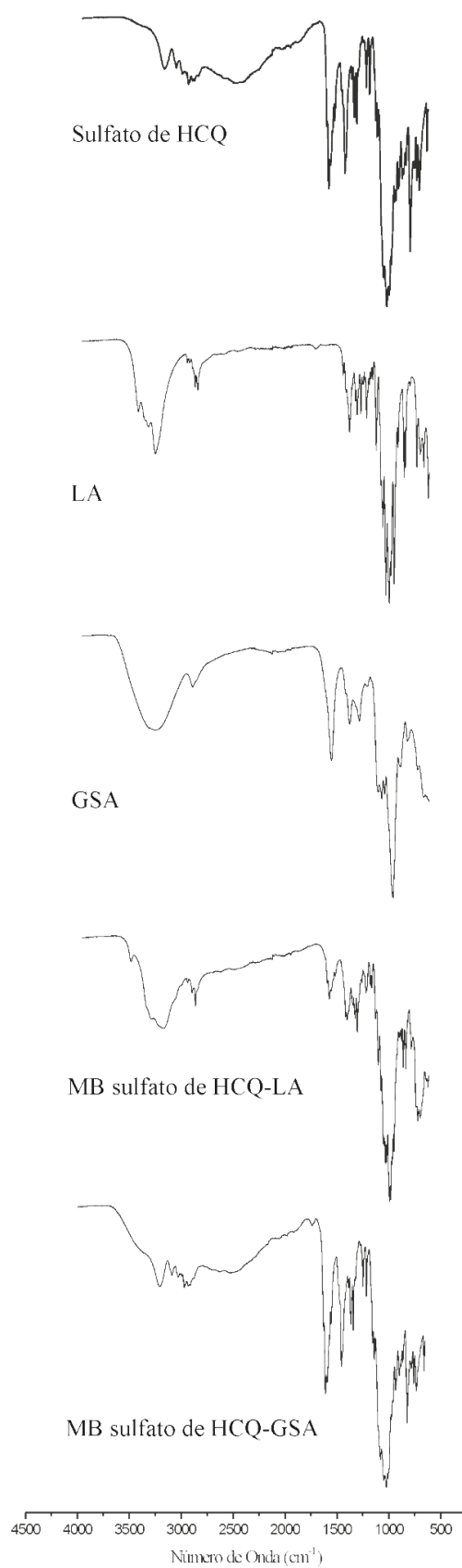
Amostra	Ordem de Reação (n)	Energia de Ativação (Ea) (KJ.mol⁻¹)	Fator de Frequência (A) (min⁻¹)	Prazo de Validade Estimado (dias)
HCQ	1	144,57	$4,910 \times 10^{12}$	622
MB HCQ-GAS	1	98,69	$1,072 \times 10^8$	446
MB HCQ-LA	1	139,31	6.452×10^{13}	414

O espectro de IV da MB sulfato de HCQ-LA (Figura 40) mostrou alguns dos mesmos estiramentos observados no espectro do fármaco isolado. Entretanto, o pico de deformação axial C-Cl alifática está ausente no MB o que confirma a incompatibilidade entre o fármaco e o excipiente, já que o cloro é um átomo muito importante para a molécula. É possível observar a redução da intensidade dos picos referentes às deformações axiais dos anéis (bandas do esqueleto) C=C e C=N. Isso pode indicar que há uma alteração da estrutura da molécula da hidroxiclороquina. O espectro ainda apresenta as deformações dos grupos funcionais presentes na lactose, destacando o estiramento axial da ligação O-H em 3300 cm⁻¹, se apresentando bastante larga e característica (SANTOS et al., 2009).

Em relação ao espectro de IV da MB sulfato de HCQ-GAS (Figura 40), foi possível observar a ocorrência dos mesmos estiramentos característicos do fármaco isolado. Entretanto, pôde-se confirmar uma forte interação entre os grupos funcionais das moléculas presentes na mistura. Isso provoca a modificação na densidade eletrônica, alterando as forças de ligação entre os átomos e provocando uma significativa redução nas frequências de absorção no infravermelho (TIBOLA, 2009).

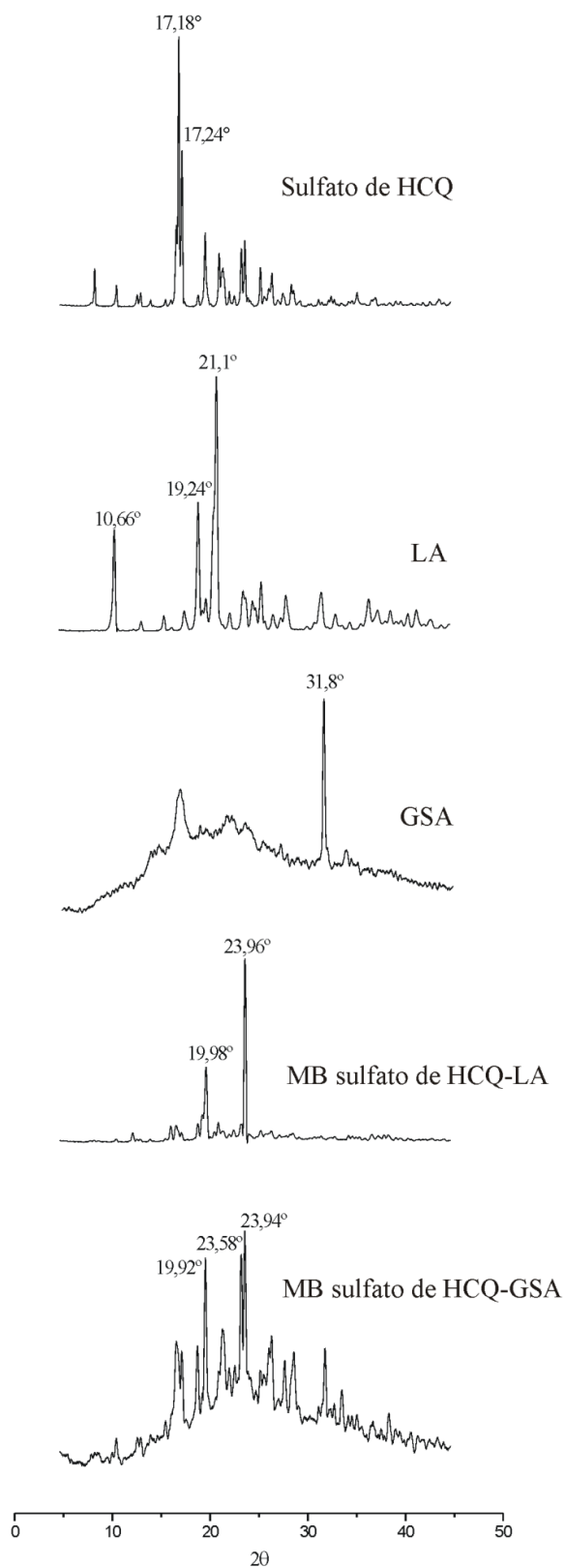
Vale salientar que em todos os espectros observou-se apenas a sobreposição das bandas características do sulfato de HCQ isolado, sendo algumas delas sobrepostas por bandas referentes aos excipientes. Entretanto, a simples sobreposição não pode ser considerada uma incompatibilidade, portanto a técnica de IV-TF não foi seletiva para evidenciar possíveis incompatibilidades entre o fármaco e os excipientes avaliados.

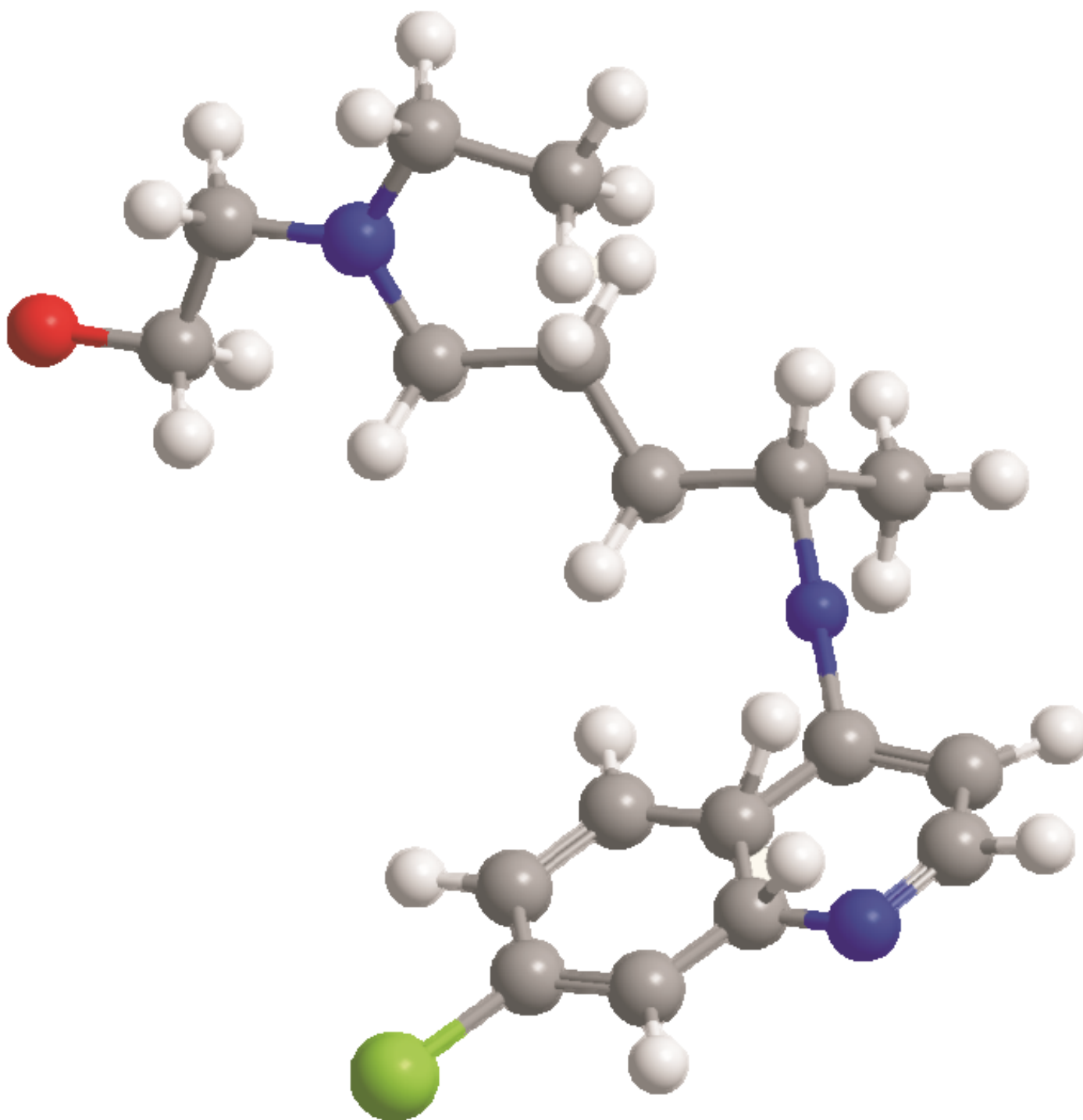
Figura 40. Espectros de infravermelho do sulfato de hidroxicloroquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico.



Os difratogramas obtidos confirmaram a existência de interação fármaco-excipiente para o GSA e a LA (Figura 41). O perfil difratométrico da MB sulfato de HCQ-GSA se mostrou bastante diferente do apresentado pelos componentes isolados, não sendo possível evidenciar nenhum dos picos característicos. No caso da MB sulfato de HCQ-LA, os picos apresentados pela MB foram semelhantes à LA isolada e nenhum dos picos característicos do fármaco foi evidenciado, logo, pôde-se confirmar a existência da interação quando uma mistura física entre os materiais é obtida. Entretanto, em ambos os casos, foi observado que o comportamento cristalino do sulfato de HCQ é mantido, uma vez que as MB apresentaram grande intensidade de picos. A partir de todos os resultados obtidos, complementares às análises termoanalíticas, pôde-se concluir que há incompatibilidade fármaco-excipiente entre o sulfato de HCQ e o GSA e a LA. Logo, durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas, devem ser utilizados outros adjuvantes capazes de promover as mesmas funções exercidas pela GSA e a LA. O GSA, conhecido por Explosol[®], é bastante utilizado como agente desintegrante, podendo ser facilmente substituído pela croscarmelose sódica. Já a LA, muito utilizada como diluente, pode ser substituída pelo amido de milho. Vale salientar que a compatibilidade do sulfato de HCQ com a croscarmelose sódica com o amido foi confirmada pelo presente estudo (ROWE, SHESKEY & QUINN, 2009).

Figura 41. Difratomogramas do sulfato de hidroxicloroquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico.



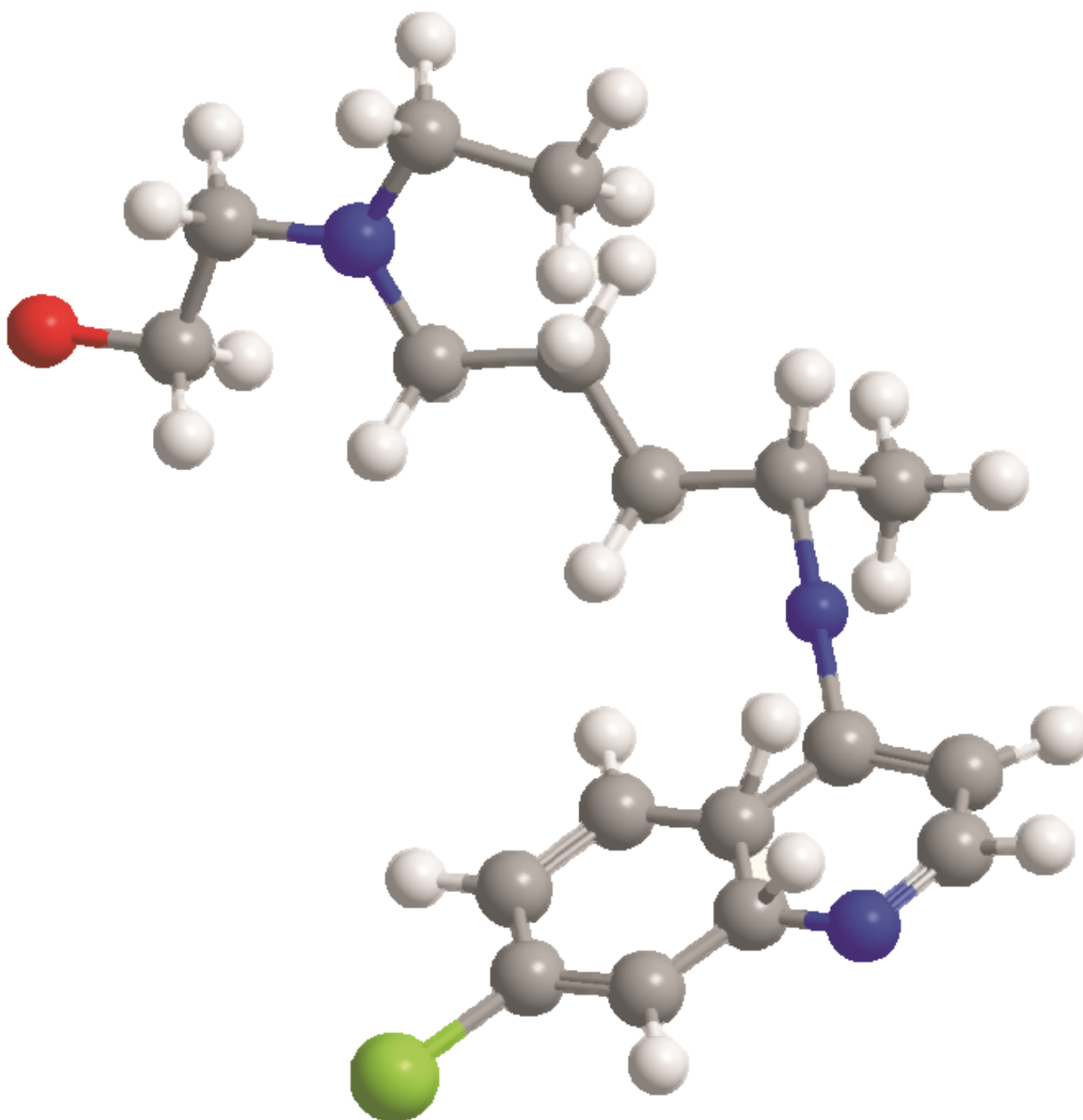


CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- ✓ Através da aplicação do *QbD* e da elaboração da árvore decisória, foi possível elaborar a carta de identidade do sulfato de HCQ, um robusto dossiê sobre a natureza físico-química do fármaco. As informações obtidas no presente estudo são capazes de fornecer subsídios para o delineamento racional de formas farmacêuticas, abrangendo todo o setor produtivo, desde a identificação e armazenamento da matéria-prima ao controle de qualidade a forma farmacêutica;
- ✓ O trabalho apresentou resultados relevantes e complementares à monografia específica de compêndios oficiais do sulfato de HCQ, principalmente no que diz respeito à otimização do método analítico de doseamento por CLAE. Uma maior atenção deve ser dada a estes resultados quando se menciona a ausência de monografia específica do sulfato de HCQ na Farmacopeia Brasileira. Com isso, pode-se possibilitar a padronização das condições de estabilidade do fármaco em questão, seja a própria matéria-prima ou o medicamento que o contém;
- ✓ O método analítico por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis possui as vantagens de: utilizar apenas água como solução diluente e de preparar a amostra através de diluição direta, deixando-o mais rápido, economicamente mais viável e sustentável, diante dos conceitos da química verde. Uma vez otimizado, o método foi validado de acordo com o preconizado pela RE nº 899/03 da ANVISA e pelo ICH e demonstrou-se: linear, eficaz e seletivo, preciso e exato e robusto para os parâmetros avaliados. Além disso, a metodologia se mostrou adequada para substituir aquela oficial recomendada pela USP 36, pois não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos por ambas as técnicas;
- ✓ Com base nos resultados obtidos, será realizada a obtenção tecnológica de uma forma farmacêutica sólida à base de sulfato de hidroxiclороquina para o tratamento alternativo da artrite reumatoide, seguido dos controles de qualidade pertinentes;
- ✓ Após a obtenção tecnológica da forma farmacêutica, será desenvolvido método indicativo de estabilidade e estudo de estabilidade acelerada e de longa duração do sulfato de hidroxiclороquina matéria-prima – conforme a normativa da RDC 45/2012 – e da forma farmacêutica obtida – conforme a normativa RE 01/2005;
- ✓ Depois de estabelecidos todos os métodos e protocolo de estabilidade da forma farmacêutica, serão realizados a elaboração e depósito da patente da nova forma farmacêutica;

- ✓ Os resultados do estudo de compatibilidade de certas misturas binárias foram analisados usando DSC, TG/DTG, IV e DR-X. Os resultados mostraram a utilidade da análise térmica como um método rápido e conveniente para a realização de uma triagem de candidatos a excipientes durante os estudos de pré-formulação, pois permitiu a demonstração de interações ou incompatibilidade fármaco-excipiente. Nestes estudos, a incompatibilidade do sulfato de HCQ com o glicolato de amido sódico e a lactose foi observada e confirmada por estudos cinéticos (isotérmicos e não isotérmicos). Estes estudos indicaram uma significativa redução na energia de ativação da temperatura de decomposição do fármaco quando na mistura binária, o que implica na redução da sua estabilidade térmica. As técnicas complementares ainda evidenciaram as mudanças dos comportamentos e perfis térmicos, espectrais e difratométricos, o que corrobora ainda mais a incompatibilidade entre os excipientes e o sulfato de HCQ;
- ✓ O trabalho ainda forneceu informações relevantes sobre o comportamento térmico do sulfato de HCQ através de diversas técnicas termoanalíticas. Em relação ao seu estudo cinético, a comparação entre os métodos isotermais e não-isotermais demonstrou a boa semelhança entre os valores de energia de ativação obtidos em cada um dos métodos, evidenciado a alta estabilidade térmica do fármaco e a aplicabilidade dos métodos cinéticos. A cinética de decomposição térmica ocorreu a uma velocidade constante e indicou uma reação de primeira ordem – corroborada por diferentes modelos e confirmada para ambos os modelos cinéticos –, o que significa que a decomposição térmica do insumo farmacêutico ativo não é influenciada por processos simultâneos.
- ✓ Ainda foi possível avaliar a influência positiva que os excipientes do Plaquinol[®] exercem sobre o sulfato de hidroxicloroquina, caracterizada pelo aumento do prazo de validade estimado (de 622 para 790 dias) e pelas alterações benéficas sobre os comportamentos térmicos, ora retardando a temperatura de degradação, ora reduzindo a porcentagem de perda de massa;
- ✓ Prosseguindo com o estudo da avaliação da influência exercida por uma mistura de excipientes sobre o sulfato de hidroxicloroquina em uma forma farmacêutica sólida comprimido, será feita a aquisição dos excipientes utilizados no Plaquinol[®], seguido de estudo de compatibilidade do fármaco com tais excipientes.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D.; YOCUM, D. E.; BELL, C. L. Hydroxychloroquine in the treatment of rheumatoid arthritis. **The American Journal of Medicine**. v. 75, n. 2, p. 321–326, 1983.
- AGUIRRE-CRUZ, L. et al. Short communication: preferential concentration of hydroxychloroquine in adenoid tissue of HIV-infected subjects. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 3, p. 339–42, 2010.
- ALARCÓN, G. S. Epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.**, v. 21, n. 3, p. 589-604, 1995.
- ALARCON, G. S. et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 9, p. 1168–72, 2007.
- ALBERS, J. M. C. et al. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 60, n. 5, p. 453-8, 2001.
- ALEHATA, D. et al. The 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European Union League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 2, p. 1580–8, 2011.
- ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism** v. 62, n. 9, p. 2569–81, 2010.
- ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S. W. A stress testing benchmarking study. **Pharm Technol.**, v. 27, n. 2, p. 60–72, 2003.
- ALVES, G. M. C., et al.. Purificação e caracterização da beta-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008

ALVES, R. **Estudo termooanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos na área de Produção e Controle Farmacêuticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 90 p.

ALVES, R. et al. Thermal behavior and decomposition kinetics of Rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions, **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, n. 2, p. 343–51, 2010.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry – Theory and Practice**. Oxford UP: Oxford, 1998, p. 30.

ANSEL, H. C.; LOYD V. A.; POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

APPENZELLER, S.; MARINI, R.; COSTALLAT, L. T. L. Curva de Sobrevida e Fatores Prognósticos no Lúpus Eritematoso Sistêmico Infanto-Juvenil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 45, n. 4, p. 195-200, 2005.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Effects of experimental conditions on the estimation of kinetic parameters of the thermal decomposition of AZT using factorial design. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, n. 3, p. 697-701, 2005.

ARAUJO, R. F. M. et al. New alternative analytical to quantify the anti-leprosy drug dapsone by UV spectrophotometry. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 2, p. 265-270, 2012.

ARDOIN S. P.; SANDBORG, C.; SCHANBERG, L. E. Management of dyslipidemia in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 16, n. 8, p. 618–26, 2007.

ARGUELHO, M. L. P. M.; ANDRADE, J. F; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical Study of Hydroxychloroquine and Its Determination in Plaquenil by Differential Pulse Voltammetry. **J Pharm Biom Anal**, v. 32, n. 2, p. 269-275, 2003.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termooanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina, 2014.

ARNAL, C. et al. Treatment of severe immune thrombocytopenia associated with systemic lupus erythematosus: 59 cases. **J Rheumatol**, v. 29, n. 1, p. 75–83, 2002.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n. 3, p. 315-24, 1988.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025 : Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios. Rio de Janeiro. 2001. 13f.

AZAMI, S.; ROA, N.; LOBEMBRG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **Int. J. Pharm.**, v. 328, n. 1, p. 12-21, 2007.

AZEVEDO, A. B.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value Health**, v. 11, n. 5, p. 869-77, 2008.

BAERTSCHI, S. W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 758- 767, 2006.

BAERTSCHI, S.W. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 482 p.

BARKER, T. B. **Quality by experimental design**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 712 p.

BECKHAUSER, A. P.; WALLIM, L.; SCHMIDT, L.; SILVA, M. B.; SKARE, T. L. Lesões Palpebrais no Lúpus Eritematoso. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n. 3, p. 188-191, 2008.

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 1, n. 10, p. 6-14, 2009.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quím. Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-91, 2005.

BORGES, D. B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 229-236, 2005.

BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (DOU de 02/06/2002) - Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html>. Acesso em: 31 de janeiro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autorizar ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 31 de janeiro de 2014.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. London, 2008. p. 1099.

BROCKS, D. R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 42, n. 15, p. 1359-1382, 2003.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termoanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina, 2014.

BROCKS, D. R.; PASSUTTO, F. M.; JAMALI, F. Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers. **J. Chromatogr.**, v. 581, n. 1, p. 83-92, 1992.

BRUNI, G. et al. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 193-210, 2010.

BUCCI, R.; MAGRI, A. D.; MAGRI, A. L. DSC in the chemical analysis of drugs. Determinations of diclofenac in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 61, n. 2, p. 369-76, 2000.

CAIROLI, E. et al. Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. **Lupus**, v. 21, n. 11, p. 1178-82, 2012.

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. **J. Chromatogr. A**, v. 719, n. 1, p. 3-13, 1996.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **J. Chromatogr. A**, v. 694, n.1, p. 39-48, 1995.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 31, n. 8, p. 747-56, 2005.

CARAMORI, G. F.; OLIVEIRA, K, T. Aromaticidade – evolução histórica do conceito e critérios quantitativos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1871-1884, 2009.

CARDOSO, C. D. **Avaliação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar no Estudo in vitro do Metabolismo Enantiosseletivo da hidroxiclороquina**. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. 112 p.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termoanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxiclороquina, 2014.

CARDOSO, C. D.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an in vitro metabolic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 703–708, 2005.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHAUHAN, K. et al. Synthesis and biological evaluation of a new class of 4-aminoquinoline–rhodanine hybrid as potent anti-infective agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 693–704, 2013.

CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. D. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L:). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 573-584, 2009.

CHEHATA, J. C. et al. Mortality in rheumatoid arthritis: relationship to single and composite measures of disease activity. **Rheumatology**, v. 40, n. 4, p. 447-52, 2001.

CHIANG, G. et al. Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine. **Clin Ther**, v. 18, n. 6, p. 1080–92, 1996.

CIDES, L. C. S. et al. Thermal behavior, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-5, 2006.

CLARK, P. et al. Hydroxychloroquine Compared with Placebo in Rheumatoid Arthritis. A Randomized Controlled Trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, n. 11, p. 1067-1071, 1993.

CONCEIÇÃO, M. M. **Estudo da degradação térmica de adoçante com aspartame**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004. 134 p.

COSTA, S. P. M. et al. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta (Print)**, v. 562, p. 29-34, 2013.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. et al. Hydroxychloroquine dans le traitement du lupus : le renouveau Hydroxychloroquine and systemic lupus: a reappraisal. **La Revue de Médecine Interne**, v. 29, n. 9, p. 735–737, 2008.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 10, p. 3284–90, 2006.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. et al. Safety of hydroxychloroquine in pregnant patients with connective tissue diseases. Review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 2, p. 111–115, 2005.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. et al. Why all systemic lupus erythematosus patients should be given hydroxychloroquine treatment? **Joint Bone Spine**, v. 77, n. 1, p. 4–5, 2010.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. Étude des facteurs associés à une concentration basse d'hydroxychloroquine (HCQ) chez 365 patients inclus dans l'étude PLUS (Plaquénil LUPus Systémique, étude française multicentrique). **La Revue de Médecine Interne**, v. 30, n. 2, p. 43–S44, 2009.

DEVLIN, J et al. The acute phase and function in early rheumatoid arthritis. C-reactive protein levels correlate with functional outcome. **J Rheumatol**, v. 24, n. 1, p. 9-13, 1997.

DIXON, W. G.; SYMMONS, D. P. Does early rheumatoid arthritis exist? **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 19, n. 1, p. 37-53, 2005.

DONGRE, V. G. et al. Identification and characterization of process related impurities in chloroquine and hydroxychloroquine by LC/IT/MS, LC/TOF/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 4, p. 873–9, 2009.

DRUGBANK OPEN DATA DRUG & DRUG TARGET DATABASE. **University of Alberta**. Disponível em: < <http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 5 maio 2013

DUBOIS, E. L. Antimalarials in the management of discoid and systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**, v. 8, n. 1, p. 33–51, 1978.

DUCHARME, J. et al. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after oral of the racemate to healthy subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 40, n. 2, p. 127-33, 1995.

DUCHARME, J.; et al. Stereoselective distribution of hydroxychloroquine in the rabbit following single and multiple oral doses of the racemate and the separate enantiomers. **Chirality**, v. 6, n. 4, p. 337-346, 1994.

EASTERBROOK, M. Long term case of antimalarial toxicity after cessation of treatment. **Can J Ophthalmol**, v. 27, p. 237–9, 1992.

EASTERBROOK, M. The Ocular Safety of Hydroxychloroquine. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 23, n. 2, (suppl 1), p. 62-67, 1993.

EGAN, T. J. Quinoline antimalarials. **Exp Opin Ther Patent**, v. 11, n. 2, p. 185-209, 2001.

ELMAN, A. et al. Chloroquine retinopathy in patients with rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 5, n. 3, p. 161–6, 1976.

EMERY, P.; SALMON, M. Early rheumatoid arthritis: time to aim for remission?. **Ann Rheum Dis.**, v. 54, n. 12, p. 944–947, 1995.

ERNST, E.; ROSE, M.; LEE, R. Modification of transoperative changes in blood fluidity by hydroxychloroquine: a possible explanation for the drug's antithrombotic effect. **Pharmatherapeutica**, v. 4, n. 1, p. 48–52, 1984.

FARIAS, D. F. et al. Lúpus comedônico: rara apresentação do lúpus eritematoso discoide. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86(Suppl. I), p. 89-91, 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1-2, 2010, 545p.

FELIX, F. S. et al. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 877-80, 2009.

FERREIRA, P. A. **Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida à base de Baccharis trimera (Less.) DC.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012, 144p.

FESSLER, B. J. et al. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 5, p. 1473-80, 2005.

FESSLER, B. J. et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. [Arthritis Rheum](#), v. 52, n. 5, p. 1473-80, 2005.

FIEGER, H.; IREDALE, J.; WAINER, I.W. Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of a reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio. **Chirality**, v. 5, n. 2, p. 65-70, 1993.

FIESE, E. F., HAGEN, T. A. Pré-formulação. In: LACHMAN, L. LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p. 313-320.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3. ed. São Paulo: Edusp, 2003. p. 711.

FOX, R. I. et al. Treatment of primary Sjogren's syndrome with hydroxychloroquine. **AmJMed**, v. 85(suppl 4A), p. 62-7, 1988.

FRANCÈS, C. et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine in patients with refractory cutaneous lupus erythematosus: a French multicenter prospective study. **Arch Dermatol**, v. 148, n. 4, p. 479–84, 2012.

FRIED, K.; WAINER, I.W. Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when. **J. Chromatogr. B.**, v. 689, n. 1, p. 91-104, 1997.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F.; Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

GARCIA-AMOEDO, L. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geleia real. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 676-679, 2002.

GARRETT, E. R.; CARPER, R. F. Prediction of stability in pharmaceutical preparations I. Color stability in a liquid multisulfa preparation. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Edition)**, v. 44, n. 8, p. 515-518, 1955.

GASPARYAN, A. Y. et al. Adverse cardiovascular effects of antirheumatic drugs: implications for clinical practice and research. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 11, p. 1543–55, 2012.

GASS, J. D. M. Toxic disease affecting the pigment epithelium and retina: chloroquine (Aralen®) and hydroxychloroquine (Plaquenil®) retinopathy. In: GASS, J. D. M. **Stereoscopic atlas of macular disease: diagnosis and treatment**. 4. ed. St Louis: Mosby-Year Book, 1997. p. 4557-73.

GAUJOUX-VIALA, C. et al. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 1004–9, 2010.

GLANZNER, A. L.; SILVA, D. M. **A formação de sais no desenvolvimento de fármacos.** Rev Átomo - SINQFAR, n. 8, 2010. Disponível em: <
http://sinqfar.org.br/admin/files/artigos/artigos_pdf/57a7a66c4e73164a56498cc5fddb9d.pdf
 >. Acesso em: 05 maio 2012.

GOELDNER, I. et al. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 975-980, 2011.

GOLDMAN, F. D. et al. Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3460-6, 2000.

GOTZSCHE, P. C.; JOHANSEN, H. K. Short-term low-dose corticosteroids vs placebo and nonsteroidal antiinflammatory drugs in rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, 2004.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry News & Features*, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, 1996.

GUSTAFSSON, L. L. et al. The pharmacokinetics of (+)-and (-)-chloroquine in patients with rheumatoid arthritis. In: World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3., 1986, Stockholm. **Anais...** Stockholm: 1986

HABERKORN, A.; KRAFT, H. P.; BLASCHKE, G. Antimalarial activity of the optical isomers of chloroquine diphosphate. **Tropenmed Parasitol.**, v. 30, n. 3, p. 308-12, 1979.

HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis: Principles, Application and Problems.** 1. ed. London: Chapman & Hall, 1995. 286p.

HAMILTON, E. B. D.; SCOTT, J. T. Hydroxychloroquine sulfate (Plaquenil) in treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 5, n. 5, p. 502-512, 1962.

HANCOCK, B. C.; YORK, P.; ROWE, R. C. The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, n. 1, p. 1-21, 1997.

HENKIND, P.; ROTHFIELD, N. F. Ocular abnormalities in patients treated with synthetic antimalarial drugs. **N Engl J Med.**, v. 269, p. 433-9, 1963.

HOBBS, H. E.; EADIE, S. P.; SOMERVILLE, F. Ocular lesions after treatment with chloroquine. **Br J Ophthalmol.**, v. 45, n. 4, p. 284-97, 1961.

HOBBS, H. E.; SORSBY, A.; DREEDMAN, A. Retinopathy following chloroquine therapy. **Lancet**, v. 274, n. 7101, p. 478-80, 1959.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321–334, 2004.

HUYNH-BA, K. **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. New York: Editor Springer, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for Industry, Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003. 18 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for Industry Q9 – Quality Risk Management, 2005. 19 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for Industry Q10 – Pharmaceutical Quality System, 2008. 17 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for Industry Q8(R2) – Pharmaceutical Development, 2009. 24 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for Industry Q2(R1) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005. 13 p.

IONASHIRO, M. A.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

IONASHIRO, M.; GIOLITO: **Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2005. 80 p.

IREDALE, J.; FIEGER, H.; WAINER, I.W. Determination of the stereoisomers of hydroxychloroquine and its metabolites in plasma and urine following a single oral administration of racemic hydroxychloroquine. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 23, n. 2, suppl. 1, p. 74-81, 1993.

IREDALE, J.; WAINER, I. W. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral—chiral high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr.**, v. 573, n. 2, p. 253–258, 1992.

IZMIRLY, P. M. et al. Evaluation of the risk of anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus in fetuses of mothers with systemic lupus erythematosus exposed to hydroxychloroquine. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 10, p. 1827–30, 2010.

IZMIRLY, P. M. et al. Maternal use of hydroxychloroquine is associated with a reduced risk of recurrent anti-SSA/Ro-antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus. **Circulation**, v. 126, n. 1, p. 76–82, 2012.

JAMES, J. A. et al. Hydroxychloroquine sulfate treatment is associated with later onset of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 16, n. 6, p. 401–9, 2007.

JOHANSSON, E.; FORSBERG, K.; JOHNSON, H. Clinical and experimental evaluation of the thromboprophylactic effect of hydroxychloroquine sulfate after total hip replacement. **Haemostasis**, v. 10, n. 2, p. 89–96, 1981.

JOHNSON, R.; CHARNLEY, J. Hydroxychloroquine in prophylaxis of pulmonary embolism following hip arthroplasty. **Clin Orthop Relat Res**, v. 144, p. 174–7, 1979.

JURAN, J. M. **Juran planejando para a qualidade**. Tradução: João Mário Csillag.; Cláudio Csillag. 3. ed. São Paulo: Pioneira, 1995. 308 p.

KAISER, R.; CLEVELAND, C. M.; CRISWELL, L. A. Risk and protective factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus: results from a large, multiethnic cohort. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 2, p. 238–41, 2009.

KANG, L.; MIKULS, T. R.; O'DELL, J. R. Hydroxychloroquine: a diabetic drug indisguise? **BMJ Case Rep**, 2009.

KASITANON, N. et al. Hydroxychloroquine use predicts complete renal remission within 12 months among patients treated with mycophenolate mofetil therapy for membranous lupus nephritis. **Lupus**, v. 15, n. 6, p. 366–70, 2006.

KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 45, n. 8, p. 3245-64, 2010.

KAVANAUGH, A. et al. Hydroxychloroquine effects on lipoprotein profiles (the HELP trial): a double-blind, randomized, placebo-controlled, pilot study in patients with systemic lupus erythematosus. **J Clin Rheumatol**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 1997.

KERSLEY, G. D.; PALIN, A. G. Amodiaquine and hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 2, n. 7108, p. 886-888, 1959.

KHAN, KA, RHODES, CT. The concept of dissolution efficiency. **J Pharm Pharmacol.**, v. 27, p. 48-9, 1975

KLARENBECK, N. B. et al. Recent advances in the management of rheumatoid arthritis. **BMJ**, v. 341, 2010.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 373, n. 9664, p. 659–72, 2009.

KLICK, S. et al. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, n. 2, p. 48-66, 2005.

KOYAMA, F. C. **Caracterização de putativo receptor serpentina e estudos sobre a implicação do sistema de ubiquitina/proteossomo na modulação do ciclo celular de Plasmodium falciparum**. 2012. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KRUIZE, A. A. et al. Hydroxychloroquine treatment for primary Sjogren's syndrome: a two year double blind crossover trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, n. 5, p. 360-4, 1993.

KUZNIK, A. et al. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. **J Immunol**, v. 186, n. 8, p. 4794–804, 2011.

LA ROCA, M. F.; SOARES- SOBRINHO, J. L.; NUNES, L. C. C.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. *Rev. Bras. Farm*, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LAKHANPAL, S. et al. Sjogren's syndrome: treatment with D-penicillamine and hydroxychloroquine. **J Rheumatol**, v. 12, n. 5, p. 1028-9, 1985.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903-11, 2001.

LEE, S. J.; SILVERMAN, E.; BARGMAN, J. M. The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, n. 12, p. 718–29, 2011.

LEHMAN, A. J. et al. A 48-week, randomized, doubleblind, double-observer, placebo-controlled multicenter trial of combination methotrexate and intramuscular gold therapy in rheumatoid arthritis: results of the METGO study. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 5, p. 1360-70, 2005.

LEITE, F. Validação em Análise Química. 3. ed. São Paulo: Editora Átomo, 1989.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termoanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina, 2014.

LEVY, R. A. O. Uso de Drogas Anti-Reumáticas na Gravidez. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 3, p. 124-33, 2005.

LIMA, E. M. **Propriedades reológicas aplicáveis à tecnologia de formas farmacêuticas sólidas. Fármacos e Medicamentos**, São Paulo, n. 4, p. 20-30, 2000.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quím. Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIMA, A. A.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SILVA, J.L.; CORRÊA-JÚNIOR, R. A.; LYRA, M. A.; SANTOS, F. L.; OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzonidazole solubility. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 6, p. 2443-51, 2011 doi: 10.1002/jps.22436.

LOUZADA-JUNIOR, P. et al. Descriptive analysis of the demographical and clinical characteristics of the patients with rheumatoid arthritis in the State of São Paulo, Brazil. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n. 2, p. 84-90, 2007.

LOWELL, S.; SHIELDS, J. E. **Powder Surface Area and Porosity**. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1991. 256p.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 59, n. 3, p. 657-61, 2000.

MACÊDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. Thermal characterization of lapachol by means of tg and dsc coupled to a photovisual system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, n. 2, p. 751-6, 2001.

MACHADO, A. A. S. C. Dos primeiros aos segundos doze princípios da química verde. **Quim. Nova**, v. 35, n. 6, p. 1250-1259, 2012.

OLSEN, N. J.; SCHLEICH, M. A.; KARP, D. R. Multifaceted effects of hydroxychloroquine in human disease. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 2, p. 264-72, 2013.

MACHADO, L. D. B.; MATOS, J. R. Análise térmica – Termogravimetria. In: CANEVAROLO-JR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. p. 209-61.

MACKENZIE, A. H. Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 75, n. 1, p. 40-5, 1983.

MAHLE, F.; GOELZER, F.; ADRIANO, J.; FELIPPE, M.; VIER, N.; CARLI, R.B.G.; ROSA, T.; COUTO, A.G.; LUCINDA-SILVA, R.M. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.3, p. 265 - 271, 2007

MAINLAND, D.; SUTCLIFFE, M. I. Hydroxychloroquine sulfate in rheumatoid arthritis, a six month double blind trial. **Bull. Rheum. Dis.**, v. 13, p. 287-290, 1962.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANSILLA, E. et al. The lysosomotropic agent, hydroxychloroquine, delivered in a biodegradable nanoparticle system, overcomes drug resistance of B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 25, n. 1, p. 97–103, 2010.

MARMOR, M. F. et al. American Academy of Ophthalmology. Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. **Ophthalmology**, v. 118, n. 2, p. 415-22, 2011.

MARQUARDT, K.; ALBERTSON, T. E. Treatment of hydroxychloroquine overdose. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 5, p. 420–4, 2001.

MARQUES-NETO, J. F. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Rev. bras. Reumatol**, v. 33, n. 5, p. 169-73, 1993.

MARSHALL, K. Compressão e consolidação de sólidos em pó. In: LACHMAN, L. LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p. 129-30.

MATOS, R. M.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise Térmica Aplicada a Fármacos de Medicamentos. In: **Ciências Farmacêuticas – Biofarmacotécnica**. STOPPIS, S. et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MAVRIKAKIS, I. et al. The incidence of irreversible retinal toxicity in patients treated with hydroxychloroquine: a reappraisal. **Ophthalmology**, v. 110, n. 7, p. 1321-6, 2003.

MAVRIKAKIS, M. et al. Retinal toxicity in long term hydroxychloroquine treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 55, n. 3, p. 187–9, 1996.

MCCLESNEY, E. W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. **Am J Med.**, v. 75, n. 1A, p. 11-8, 1983.

MCLACHLAN, A. J. et al. Disposition and absorption of hydroxychloroquine enantiomers following a single dose of the racemate. **Chirality**, v. 6, n. 4, p. 360-364, 1994.

MCLACHLAN, A. J. et al. Disposition of the enantiomers of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis following multiple doses of the racemate. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 36, n. 1, p. 78-81, 1993.

MCLACHLAN, A. J.; TETT, S. E.; CUTLER, D. J. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in biological fluids using an alpha 1-acid glycoprotein stationary phase. **J Chromatogr.**, v. 570, n. 1, p. 119–127, 1991.

MEASE, P. J. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 2, p. 261–270, 2011.

MERCER, E. et al. Hydroxychloroquine improves insulin sensitivity in obese non-diabetic individuals. **Arthritis Res Ther.**, v. 14, n. 3, 2012.

MICHAEL, F. M. et al. Revised Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy. **Ophthalmology**, v. 118, n. 2, p. 415–22, 2011.

MIRJAFARI H.; AL-HUSAIN, A.; BRUCE, I. N. Cardiovascular risk factors in inflammatory arthritis. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 4, p. 296–301, 2011.

MOLAD, Y. et al. Protective effect of hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus. Prospective long-term study of an Israeli cohort. **Lupus**, v. 11, n. 6, p. 356–61, 2002.

MONKHOUSE, D.C.; VAN CAMPEN, L. Solid state reactions—theoretical and experimental aspects. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 10, n. 8-9, p. 1175-276, 1984.

MOORE, D. E.; HEMMENS, V. J. Photosensitization by anti-malarial drugs. **Photochem Photobiol.**, v. 36, n. 1, p. 71-77, 1982.

MOORE, D.E.; TAMAT, S.R. Photosensitizing by drugs: photolysis of some chlorine-containing drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 32, n. 3, p. 172-177, 1980.

MORELAND, L. W. et al. A randomized comparative effectiveness study of oral triple therapy versus etanercept plus methotrexate in early aggressive rheumatoid arthritis: the treatment of early aggressive rheumatoid arthritis trial. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 9, p. 2824–35, 2012.

MORELAND, L. W.; O'DELL, J. R. Glucocorticoids and rheumatoid arthritis: back to the future? **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 10, p. 2553-63, 2002.

MORETTO, L. D.; CALIXTO, J. **Boas práticas de desenvolvimento de produtos**. São Paulo: SINDUSFARMA, v. 4, 2009

MORRIS, S. J. et al. Hydroxychloroquine use associated with improvement in lipid profiles in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 63, n. 4, p. 530–4, 2011.

MOTA, L. M. et al. Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 375-88, 2010.

MOTA, L. M. H. et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 51, n. 3, p. 199-219, 2011.

MOTA, L. M.; LAURINDO, I. M.; SANTOS NETO, L. L. Demographic and clinical characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 3, p. 235-48, 2010.

MOTA, L. M.; SANTOS NETO, L. L.; CARVALHO, J. F. Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity? **Clin Rheumatol**, v. 28, n. 10, p. 1127-34, 2009.

MUNRO, R. et al. Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 56, n. 6, p. 374–7, 1997.

NAVARRO, M. A. D. **Avaliação da estabilidade térmica e interações entre alfa-metildopa e alguns excipientes de uso farmacêutico através da termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001. 105 p.

NAYYAR, A. et al. 3D-QSAR study of ring-substituted quinoline class of anti-tuberculosis agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 3, p. 847-56, 2006.

NERY, C. G. C. et al. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termoanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina, 2014.

NETO, B. B.; SCARMINIO E. S.; BRUNS R. E. Como Fazer Experimentos. 4. ed. São Paulo: Bookman Companhia, 2010. 414 p.

NORD, J. E. et al. Hydroxychloroquine cardiotoxicity in systemic lupus erythematosus: a report of 2 cases and review of the literature. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 5, p. 336–51, 2004.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. 220 p.

NUVER-ZWART, I. H. et al. A double blind comparative study of sulphasalazine and hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis: evidence of an earlier effect of sulphasalazine. **Ann Rheum Dis**, v. 48, n. 5, p. 389–95, 1989.

O'DELL, J. R. et al. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: a two-year, double-blind comparison of minocycline and hydroxychloroquine. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 10, p. 2235–41, 2001.

O'DELL, J. R. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine, methotrexate and sulfasalazine, or a combination of the three medications: results of a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 5, p. 1164–70, 2002.

OFORI-ADJEI, D. et al. Enantioselective analysis of chloroquine and desethylchloroquine after oral administration of racemic chloroquine. **Ther Drug Monit.**, v. 8, n. 4, p. 457-61, 1986.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Anal Chim Acta**, v. 518, n. 1-2, p. 1-24, 2004.

OLIVEIRA, P. R. et al. Sibutramine hydrochloride monohydrate Thermal behavior, decomposition kinetics and compatibility studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 100, n. 1, p. 277-82, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; LIMA-GOMES, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quím. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLSEN, N. J.; SCHLEICH, M. A.; KARP, D. R. Multifaceted effects of hydroxychloroquine in human disease. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 2, p. 264-272, 2013.

PATON, N. I.; ABOULHAB, J. Hydroxychloroquine, hydroxyurea and didanosine as initial therapy for HIV-infected patients with low viral load: safety, efficacy and resistance profile after 144 weeks. **HIV Med**, v. 6, n. 1, p. 13–20, 2005.

PAVELKA, K. et al. Hydroxychloroquine sulphate in the treatment of rheumatoid arthritis: a double blind comparison of two dose regimens. **Ann Rheum Dis**, v. 48, n. 7, p. 542–6, 1989.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. Stamford: Books Cole, 2001. 515 p.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Rio Grande do Norte, Natal, 2013. 104 p.

PERES-FILHO, M. J.; GAETI, M. P. N.; OLIVEIRA, S. R.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M. Thermoanalytical investigation of olanzapine compatibility with excipients used in solid oral dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 255-260.

PERI, Y. et al. Sjögren's syndrome, the old and the new. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 105–117, 2012.

PETRI, M. et al. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. **Am J Med**, v. 96, n. 3, p. 254–9, 1994.

PETRI, M. Thrombosis and systemic lupus erythematosus: the Hopkins Lupus Cohort perspective. **Scand J Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 191–3, 1996.

PIECHOCK, J. T.; THOMA, K. **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2007. 470 p.

PONS-ESTEL, G. J. et al. Possible protective effect of hydroxychloroquine on delaying the occurrence of integument damage in lupus: LXXI, data from a multiethnic cohort. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 3, p. 393–400, 2010.

PONS-ESTEL, G. J. et al. Protective effect of hydroxychloroquine on renal damage in patients with lupus nephritis: LXV, data from a multiethnic US cohort. **Arthritis Rheum**, v. 61, n. 6, p. 830–9, 2009.

PORTE, L. H. M.; LEÃO, M. H. M. R.; PORTE, A. Avaliação da Porosidade de Microcápsulas Contendo Proteína Bioativa por Porosimetria de Mercúrio e Adsorção de Nitrogênio. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p. 1582-1587, 2011.

PRESMICH, G. M. A.; ROLIM, L. A.; CAVALCANTI, O. R. B. R.; SILVA, K. E. R.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico por Espectrofotometria no UV para Determinação Quantitativa do Anti-Neoplásico β -Lapachona. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 5, p. 645-695, 2010.

PROWSE, C.; PEPPER, D.; DAWES, J. Prevention of the platelet alpha-granule release reaction by membrane-active drugs. **Thromb Res**, v. 25, n. 3, p. 219–27, 1982.

QUATRARO, A. et al. Hydroxychloroquine in decompensated, treatment-refractory noninsulin-dependent diabetes mellitus. A new job for an old drug?. **Ann Intern Med.**, v. 112, n. 9, p. 678-81, 1990.

RAHMAN, P. et al. The cholesterol lowering effect of antimalarial drugs is enhanced in patients with lupus taking corticosteroid drugs. **J Rheumatol**, v. 26, n. 2, p. 325–30, 1999.

RAINES, M. F.; BHARGAVA, S. K.; ROSEN, E. S. The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 30, n. 8, p. 1726-31, 1989.

RAMOS-CASALS, M. et al. Treatment of primary sjogren syndrome, a systematic review. **Journal of American Medical Association**, v. 304, n. 4, p. 452–60, 2010.

RAMOS-CASALS, M.; FONT, J. Primary Sjögren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts. **Rheumatology**, v. 44, n. 11, p. 1354-67, 2005.

RAMOS-CASALS, M.; TZIOUFAS, A. G.; FONT, J. Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. **Ann Rheum Dis.**, v. 64, n. 3, p. 347-354, 2005. In: IMBODEN, J.; HELLMAN, D.; STONE, J. H. **Current Diagnosis and Treatment in Rheumatology**. New York: McGraw-Hill, 2007. p. 237-245.

RAU, R. et al. Radiographic outcome after three years of patients with early erosive rheumatoid arthritis treated with intramuscular methotrexate or parenteral gold. Extension of a one-year double-blind study in 174 patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 41, n. 2, p. 196-204, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. et al. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- β -Cyclodextrin. **AAPS Pharm Sci Tech.**, v. 9, n. 4, p. 1102-9, 2008.

RIBEIRO, L. H. et al. Atualizações no Tratamento do Lúpus Cutâneo. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n. 5, p. 283-90, 2008.

RIDLEY, R. G. Malaria: Dissecting chloroquine resistance. **Current Biology**, v. 8, n. 10, p. 346–9, 1998.

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. Perfil de dissolução in vitro de comprimidos de primaquina disponíveis para tratamento de malária no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 1, p. 41-5, 2008

RODRÍGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.

ROLAIN, J. M.; COLSON, P.; RAOULT, D. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 4, p. 297–308, 2007.

ROLIM, L. A. **Estudo da Degradação do Fármaco Benznidazol Utilizado no Combate a Doença de Chagas por Hidrólise, Oxidação, Fotólise e Termodegradação**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010. 128 p.

ROLIM, L. A. **Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da filariose linfática e estudo de estabilidade forçada dos fármacos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012, 202p.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th edition. 2009 London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association.

RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Antimalarials may influence the risk of malignancy in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 6, p. 815–7, 2007.

RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 20–8, 2010.

RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 15, n. 9, p. 577–83, 2006.

FERRAZ, L. R. M. Aplicação de *quality by design* e técnicas termoanalíticas no estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas à base do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina, 2014.

RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 4, p. 1-8, 2009.

RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M. A. Hydroxychloroquine: the cornerstone of lupus therapy. **Lupus**, v. 17, n. 4, p. 271-3, 2008.

SAAG, K. G. et al. American College of Rheumatology. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 59, n. 6, p. 762-84, 2008.

SACHET, J. C. et al. Chloroquine increases low-density lipoprotein removal from plasma in systemic lupus patients. **Lupus**, v. 16, n. 4, p. 273-8, 2007.

SALVIO-NETO, H.; MATOS, J. R. Compatibility and decomposition kinetics studies of prednicarbate alone and associated with glyceryl stearate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, n. 1, p. 393-9, 2011.

SALVIO-NETO, H.; NOVA'K, C. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi-solid pharmaceutical form, **J.Therm. Anal. Calorim.**, v. 97, n. 1, p. 367-74, 2009.

SANTANA, G. P.; RAMOS, A. M.; FABRIS, J. D. Uma estratégia adaptada para síntese de magnetita. **Quím. Nova**, v. 31, n. 2, p. 430-2, 2008.

SANTOS, A. G. et al. Kinetic study of dipivaloylmethane by Ozawa method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, n. 2, p. 591-7, 2004.

SANTOS, F. L. A. **DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDO DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE BENZNIDAZOL**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. 122 p.

SANTOS, F. M. M.; BORGES, M. C.; CORREIA, M. I. T. D.; TELLES, R. W.; LANNA, C. C. D. Avaliação do estado nutricional e da atividade física em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 6, p. 631-45, 2010.

SANTOS, J. L. et al. Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 161-165, 2009.

SAVARINO, A. et al. Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity. **AIDS**, v. 15, n. 17, p. 2221-9, 2001.

SAVARINO, A. et al. The anti-HIV-1 activity of chloroquine. **J Clin Virol**, v. 20, n. 3, p. 131-5, 2001.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, n.1-2, p. 1-6, 2010.

SEMENIUK, A. et al. Molecular geometry of antimalarial amodiaquine in different crystalline environments. **Journal of Molecular Structure**, v. 875, n. 1-3, p. 32-41, 2008.

SHAPIRO, T. A., GOLDBERG, D. D. Quimioterapia das infecções por protozoários. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 927-9.

SHARP, J. T. et al. Treatment with leflunomide slows radiographic progression of rheumatoid Arthritis. Results from three randomized controlled trials of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 3, p. 495-505, 2000.

SHIBOSKI, S. C. et al. American College of Rheumatology Classification Criteria for Sjögren's Syndrome: A Data-Driven, Expert Consensus Approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 64, n. 4, p. 475-87, 2012.

SHOJANIA, K.; KOEHLER, B. E.; ELLIOTT, T. Hypoglycemia induced by hydroxychloroquine in a type II diabetic treated for polyarthritis. **J Rheumatol**, v. 26, n. 1, p. 195–6, 1999.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, v. 4(suppl 3), p. S265-S272, 2002.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVA, N. K.; SILVA, F. A. Maculopatia tóxica por cloroquina. **Rev Bras Oftalmol.**, v. 68, n. 3, p. 161-7, 2009.

SILVA, R. M. F. et al. Thermal characterization of indinavir sulfate using TG, DSC and DSC-photovisual. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 965–8, 2009^b.

SILVERIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; PILO-VELOSO, D. A pirólise como técnica analítica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1543-52, 2008.

SINGH, A. K.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 4, p. 553-66, 2006 .

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharm Technol On-Line**, p. 1-14, 2000.

SINKO, P. J. **Martin – Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 1. ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 2008. p. 412-48.

SISÓ, A. et al. Previous antimalarial therapy in patients diagnosed with lupus nephritis: influence on outcomes and survival. **Lupus**, v. 17, n. 4, p. 281–8, 2008.

SJÖGREN, H. About keratoconjunctivitis sicca: keratitis filiformis with hypofunction of the lacrimal glands [in Dutch]. **Acta Ophthalmol (Copenh)**, v. 11(suppl 2), p. 1-151, 1933.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 964-75, 2010.

SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 4, p. 631-637, 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Chiral Separation. In: **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: Wiley-Interscience, 1997. p. 537.

SOARES, M. F. L. R. et al. Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 5, p. 688-694, 2008.

SOARES, M. F. L. R. et al. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 307-13, 2011.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. A preformulation study of a new medicine for chagas treatment: physico-chemical characterization, thermal stability and compatibility of benznidazole. **AAPS PharmSciTech.**, v. 11, n. 3, p. 1391-6, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Caracterização Físico-Química do Tripanomicida Benznidazol para o Desenvolvimento de Medicamentos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 803-807, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L. **Sistemas de vetorização do benznidazol para o tratamento da doença de chagas**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-

Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009. 164 p.

SOKKA, T. et al. Functional disability in rheumatoid arthritis patients compared with a community population in Finland. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 1, p. 59-63, 2003.

SOKKA, T. et al. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 2, p. R42, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 542 p.

SOVIZI, M. R. Thermal behavior of drugs. Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 102, n. 1, p. 285–289, 2010.

SPAHN-LANGGUTH, H. et al. Improved Enantiospecific RP-HPLC Assays for Propranolol in Plasma and Urine with Pronethalol as Internal Standard. **J Anal Toxicol**, v. 15, n. 6, p. 327-331, 1991.

SPERBER, K. et al. Comparison of hydroxychloroquine with zidovudine in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Clin Ther**, v. 19, n. 5, p. 913–23, 1997.

SPERBER, K. et al. Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. **Clin Ther**, v. 17, n. 4, p. 622–36, 1995.

STANIFORTH, J. Análise do tamanho de partícula. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 162-166.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 67–90, 2001.

STREKOWSKI, L. et al. Synthesis and quantitative structure-activity relationship analysis of 2-(aryl or heteroaryl)quinolin-4-amines, a new class of anti-HIV-1 agents. *J. Med. Chem.*, v. 34, n. 5, p. 1739-46, 1991.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. **Acta Farm Bonaer.**, v. 25, n. 4, p. 497-504, 2006.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E. ET al. Antimalarials for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, CD000959, 2000^a.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E. et al. Sulfasalazine for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, n.2, CD000958, 2000^b.

SVAROVSKY, L. **Powder Testing Guide Methods of Measuring the Physical Properties of Bulk Powders**. London: British Materials Handling Board, 1987. 146p.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

SWEETANA, S.; AKERS, M. J. Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form development. **PDA J Pharm Sci Technol.**, v. 50, n. 5, p. 330-42, 1996.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A.**, v. 906, n. 1-2, p. 127-154, 2001.

TANENBAUM, L.; TUFFANELLI, D. L. Antimalarial agents. Chloroquine, hydroxychloroquine, and quinacrine. *Arch. Dermatol.*, v. 116, n. 5, p. 587-591, 1980.

TETT, S. E. et al. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v. 27, n. 6, p. 771-9, 1989.

THE CANADIAN HYDROXYCHLOROQUINE STUDY GROUP. A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 324, n. 3, p.150–4, 1991.

The HERA Study Group. A randomized trial of hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis: The HERA study. **The American Journal of Medicine**, v. 98, n. 2, p. 156–168, 1995.

The United States Pharmacopoeia Convention. **The United States Pharmacopoeia National Formulary**. Rockville, 2010. p. 2592-3.

TIBOLA, A. P. O. V. **Estudo de compatibilidade entre a isoniazida e excipientes farmacêuticos. Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009. 140 p.

TIȚA, B. et al. Comparative kinetic study of decomposition of some diazepine derivatives under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 94, n. 2, p. 447-52, 2008.

TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221– 7, 2011.

TIȚA, B. et al. Thermal stability of ibuprofen. Kinetic study under non-isothermal conditions. **Rev. Roum. Chim.**, v. 55, n. 9, p. 553-8, 2010.

TØNNESEN, H. H. et al. Photochemical stability of antimalarial. I. Hydroxychloroquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, n. 3, p. 215–219, 1988.

TURESSON, C. et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 66, n. 1, p. 59–64, 2007.

TZIOUFAS, A. G.; MOUTSOPOULOS, H. M. Sjögren's syndrome. In: HOCHBERG, M. C. (editor) **Rheumatology**. 3. ed. New York: Mosby, 2003. 1431 p.

USP 36 – NF 31. UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. The United States Pharmacopoeia National Formulary. Rockville, 2013.

VERBEECK, R. K.; KANFER, I.; WALKER, R. B. Generic substitution: The use of medicinal products containing different salts and implications for safety and efficacy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1–2, p. 1–6, 2006.

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug–excipient compatibility testing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 633–44, 2005

VERSTAPPEN, S. M. et al. A good response to early DMARD treatment of patients with rheumatoid arthritis in the first year predicts remission during follow up. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 1, p. 38-43, 2005.

VERSTAPPEN, S. M. et al. Working status in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. **Rheumatology**, v. 49, n. 8, p. 1570-7, 2010.

VIANA, O. S. et al. Kinetic Analysis of the Thermal Decomposition of Efavirenz and Compatibility Studies with Selected Excipients. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 2, p. 211-6, 2008.

VIEIRA, A. C. Q. M. et al. Physical-chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (Dordrecht Online)**, 2013. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10973-013-3358-y>> Acesso em: 25 de janeiro de 2014. DOI.: 10.1007/s10973-013-3358-y

VISSER, H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. **Best Pract & Res Clin Rheum**, v. 19, n.1, p. 55-72, 2005.

VITALI, C. et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 61, n. 6, p. 554–8, 2002.

WALLACE, D.J. Does hydroxychloroquine sulfate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? **Arthritis Rheum**, v. 30, n. 12, p. 1435–6, 1987.

WANG, L. Z. et al. Method development and validation for rapid quantification of hydroxychloroquine in human blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 86–92, 2012.

WEINBERG, D. V.; D'AMICO, D. J. Retinal toxicity of systemic drugs. In: ALBERT D. M.; JAKOBIEC, F. A, editors. **Principles and practice of ophthalmology: clinical practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 3284-5.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 143-145.

WENDBLANT, W. W. **Thermal Analysis**. 3. ed. New York: Willey, 1986. 814p.

WEY, Y. et al. Stereoselective disposition of hydroxychloroquine and its metabolites in rats. **Chirality**, v. 7, n. 8, p. 598-604, 1995.

WHITE, N. J. et al. Hypoglycaemia in African children with severe malaria. **Lancet**, v. 1, n. 8535, p. 708–11, 1987.

WHO. **Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms**. Annex 5, WHO Technical Report Series. 863, 1996. 200 p.

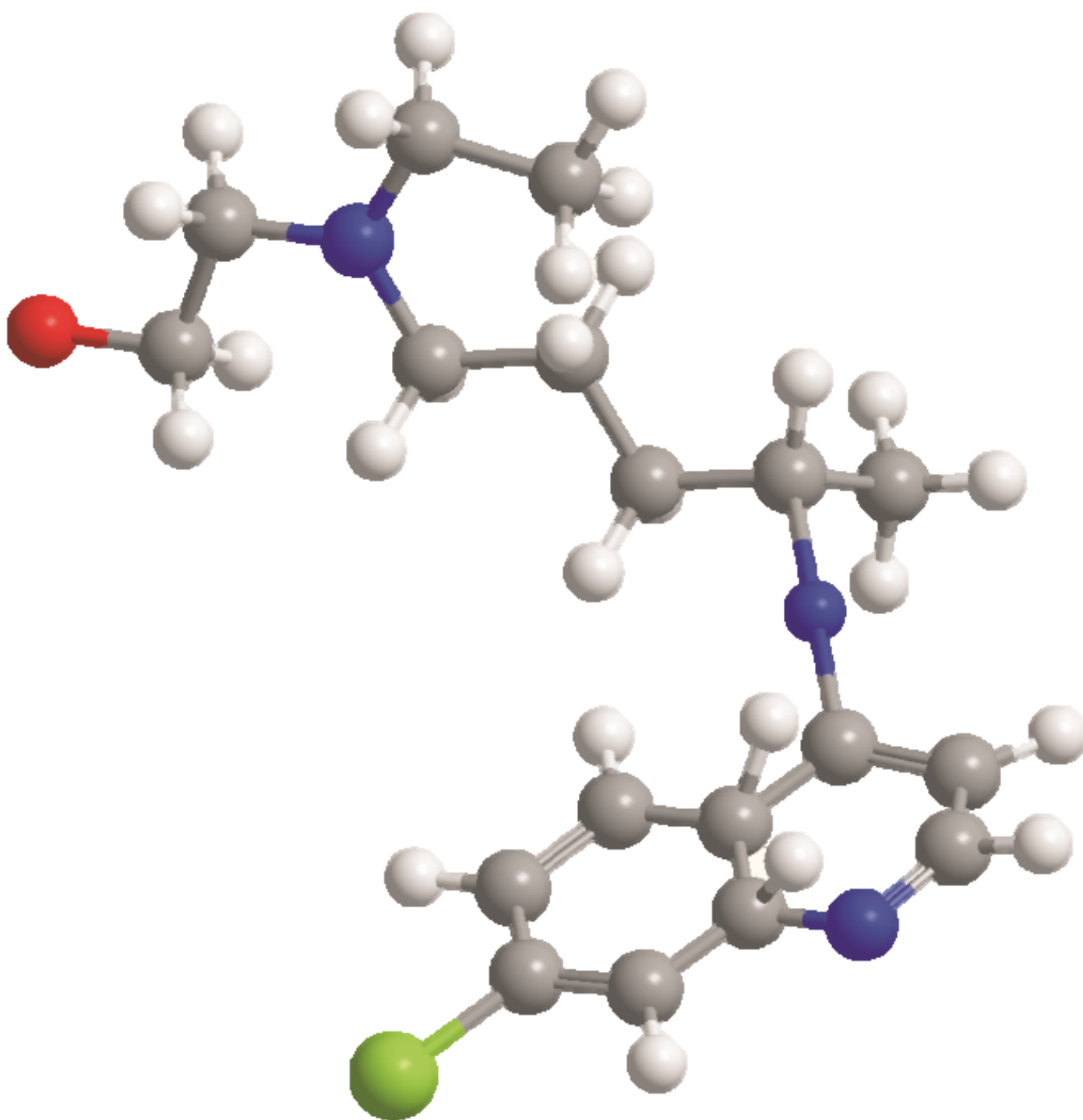
WOLFE, F. A reappraisal of HAQ disability in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 12, p. 2751–2761, 2000.

WOLFE, F.; MARMOR, M. F. Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 6, p. 775–84, 2010.

WOOD, J. H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERUAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouse Gulben Kian, 2001. p. 211.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 9, p. 646-56, 2003.

YU, L. X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 4, p. 781-91, 2008.



ANEXOS

ANEXOS

Certificado de análise do controle de qualidade – FAGRON [®]	193
Certificado de análise do controle de qualidade – Pharmanostra [®]	194
Espectros de RMN ¹ H, ¹³ C, COSY E DEPT.....	195
Comprovante de submissão do artigo intitulado: <i>QUALITY BY DESIGN</i> NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA DOSEAMENTO DO FÁRMACO ANTIRREUMÁTICO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA (submetido à <i>International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research</i>).....	199
Comprovante de submissão do artigo intitulado: ASPECTOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICOS E TECNOLÓGICOS DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA (submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada).....	200



CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CONTROLE DA QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7
Autorização Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

Pagina 14/25
Impressão 27/04/12 17:31

NF. 252.558 de 27/04/2012

Insumo: **HIDROXICLOROQUINA SULFATO USP**

Lote : 0007HS4RIICX #7	Origem : Índia	Fabric : 19/09/2011
Lote Fab: 0007HS4RIICX	Procedencia : Índia	Validade : 01/03/2016
Formula : C ₁₈ H ₂₆ CLN ₃ O ₄ H ₂ SO ₄	PM : 434.0	
DCB : 04691	DCI : 0796	CAS : 747-36-4
		Frac: 606540 14/04/2012

Categoria Terapêutica: **LUPUS ERITEMATOSO SUPRESSIVO / ANTIMALARICO**

Ensaio	Especificação	Resultado
* DESCRIÇÃO	PÓ CRISTALINO BRANCO OU PRATICAMENTE BRANCO, INODORO, TEM GOSTO AMARGO.	DE ACORDO
* SOLUBILIDADE	- FACILMENTE SOLÚVEL NA ÁGUA. - PRATICAMENTE INSOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO, ÁLCOOL E ÉTER.	DE ACORDO
* IDENTIFICAÇÃO	A) POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VISÍVEL. B) POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO. C) REAÇÃO DOS SULFATOS.	DE ACORDO
* PERDA P/SECAGEM	MÁXIMO: 2,0% (1,0 g À 105°C POR 2 HORAS).	1,32%
* DOSEAMENTO	UV-VISÍVEL: 98,0% - 102,0% BASE SECA.	100,84%
* PONTO DE FUSÃO	CERCA DE 240°C. (USP) ENTRE: 238°C - 242°C. (LF)	243,5°C
pH	CERCA DE 4,5. (SOLUÇÃO 1%) (USP) ENTRE: 3,5 - 5,5. (SOLUÇÃO 1%) (LF)	4,93
* DENSIDADE	APARENTE	0,5866 g/mL
* SOL. RESIDUAIS	- CLORETO DE METILENO: MÁXIMO 600 ppm.	0,0 ppm
*	- METANOL: MÁXIMO 3000 ppm.	0,0 ppm
*	- ÁLCOOL ISOPROPÍLICO: MÁXIMO 5000 ppm.	0,0 ppm
	ENSAIOS ADICIONAIS REALIZADOS PELO FABRICANTE	
TOTAL	IMPUREZAS: NMT 2,0%,	< 2,0%

MONOGRAFIA : USP 34 PÁGS. 1018 E 3083..

LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE CUMPRE COM USP.

NOMENCLATURA : HIDROXICLOROQUINA SULFATO.

SULFATO DE 2-[N(4-E-CORO-4-QUINOLINOAMINO)PENTIL]-N-ETILAMINO)ETANOL.

Ficha de Segurança

SEGURANÇA : ARMAZENAR EM RECIPIENTES BEM FECHADOS, AO ABRIGO DO CALOR, DA LUZ E DA UMIDADE.

Parecer Técnico : DENTRO DOS ITENS PESQUISADOS, O LOTE CUMPRE COM AS ESPECIFICAÇÕES

OBS: (*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade FAGRON e os demais estão em conformidade com o Certif.de Análise do Fabricant


 Dra. Kelly Cristina de Lima Oliveira
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP: 52.472

Dra. Cláudia Aparecida Zivieri da Silva
 Farmacêutica Responsável Técnica Substituta
 CRF-SP: 33.448

As assinaturas são válidas somente quando acompanhadas de nota fiscal

Fagron do Brasil Farmacêutica Ltda.

Rua: Jurupari, 775 / 779 / 803 - Cep 04348-070 - Jd. Oriental - São Paulo - SP
Tel.: 11 5033-3700 - Fax: 11 5033-3711 - fagron@fagron.com.br - www.fagron.com.br / www.compoundingmatters.com



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:		SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA		Pág 1		
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:		CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:		14/12/2011	
LOTE PHARMA NOSTRA:		11124539C	LOTE FABRICANTE:		SQK-111005	
DATA DE FABRICAÇÃO:		Outubro/2011	DATA DE VALIDADE:		Outubro/2013	
DCB:		04691	CAS:		747-36-4	
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:		TEMPERATURA ABAIXO DE 25°C				
OBS 1:		FM: C ₁₈ H ₂₈ ClN ₃ O ₄ ·H ₂ SO ₄				
OBS 2:		pm: 434,0				
DATA DE EMISSÃO:		22/12/2011	NF:	2-064.828	ORDEM FRACIONAMENTO:	5662-11
TESTES		ESPECIFICAÇÕES		RESULTADOS		REFERÊNCIAS
Descrição*		Pó cristalino branco ou quase branco		Pó cristalino quase branco		BP - 2009
Identificação*		IV - O aspecto da amostra está de acordo com o do padrão Positivo para Sulfato		Positivo Positivo		BP - 2009
Solubilidade*		Facilmente solúvel em água; Praticamente insolúvel em etanol (96%) e em éter		Conforme		BP - 2009
Perda por Dessecação*		≤ 2,0% (2 horas/105°C)		0,18%		BP - 2009
Acidez (pH) *		3,5 - 5,5 (Solução 1% em água)		3,97		BP - 2009
Cinzas Sulfatadas*		≤ 0,2%		0,02%		BP - 2009
Claridade da Solução		Não mais que levemente turva		Conforme		BP - 2009
Cor da Solução		Não mais que levemente amarelo		Conforme		BP - 2009
Substâncias Relacionadas		CCD		Conforme		BP - 2009
Cloreto		≤ 350 ppm		< 350 ppm		BR - 2009
Chumbo		≤ 20 ppm		< 20 ppm		BP - 2009
Teor (Base anidra) *		98,0 - 100,5%		98,73%		BP - 2009
TESTE ADICIONAIS						
Densidade Aparente*		Informativo (Sem compactação)		0,80 g/mL		Met.Geral FB V

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANÁPOLIS) . E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

- Feg = 1,00 (Manual de Equivalência da Anfarmag - 3ª Edição) .

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ Pharma Nostra) .

nº 6577
Qnt. 5kg

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
Danielle Rocha Earbosa - CRF-GO Nº 7003

Responsável Técnico
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO Nº 1829



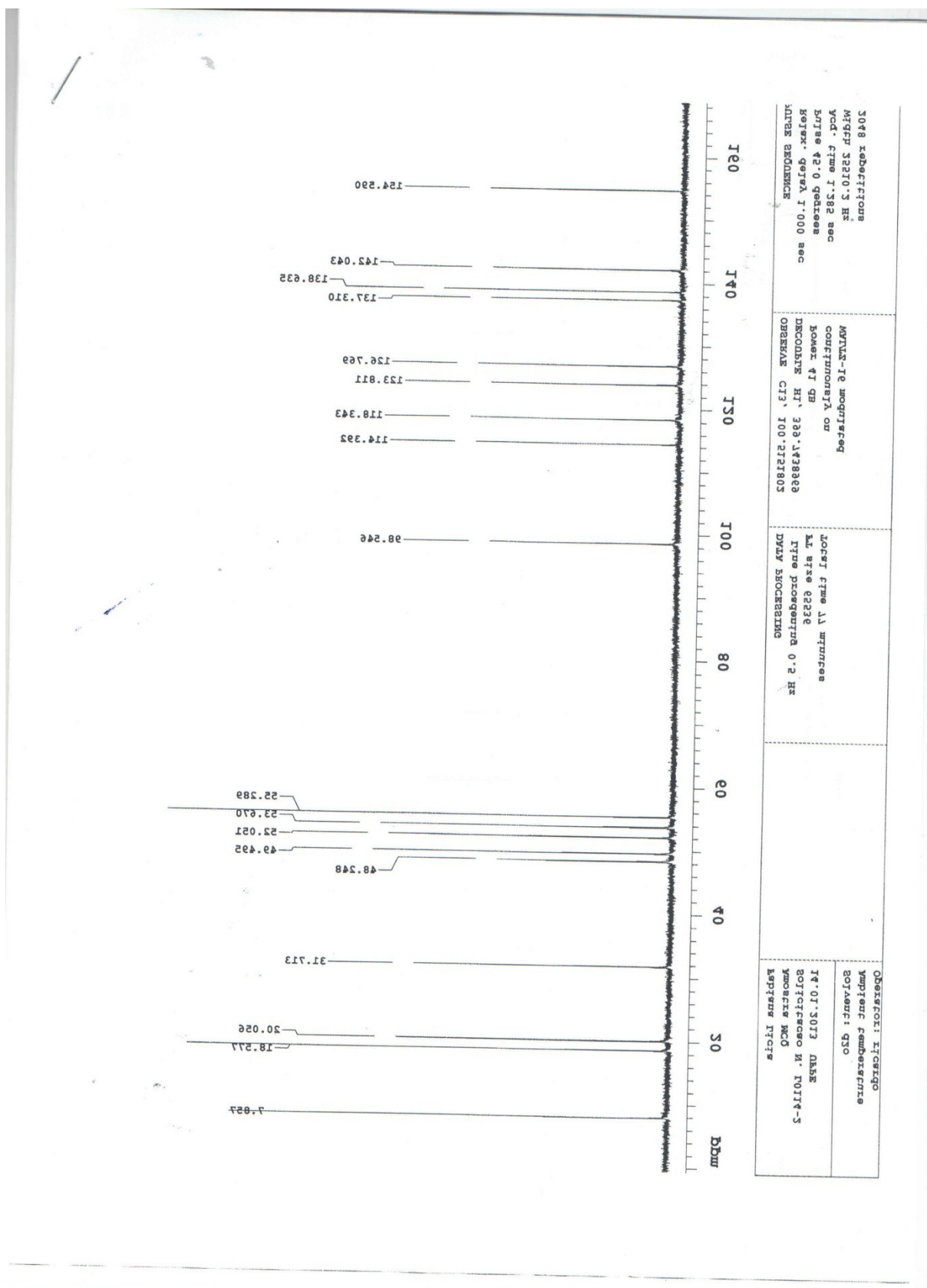
Magistral 0800 707 07 06

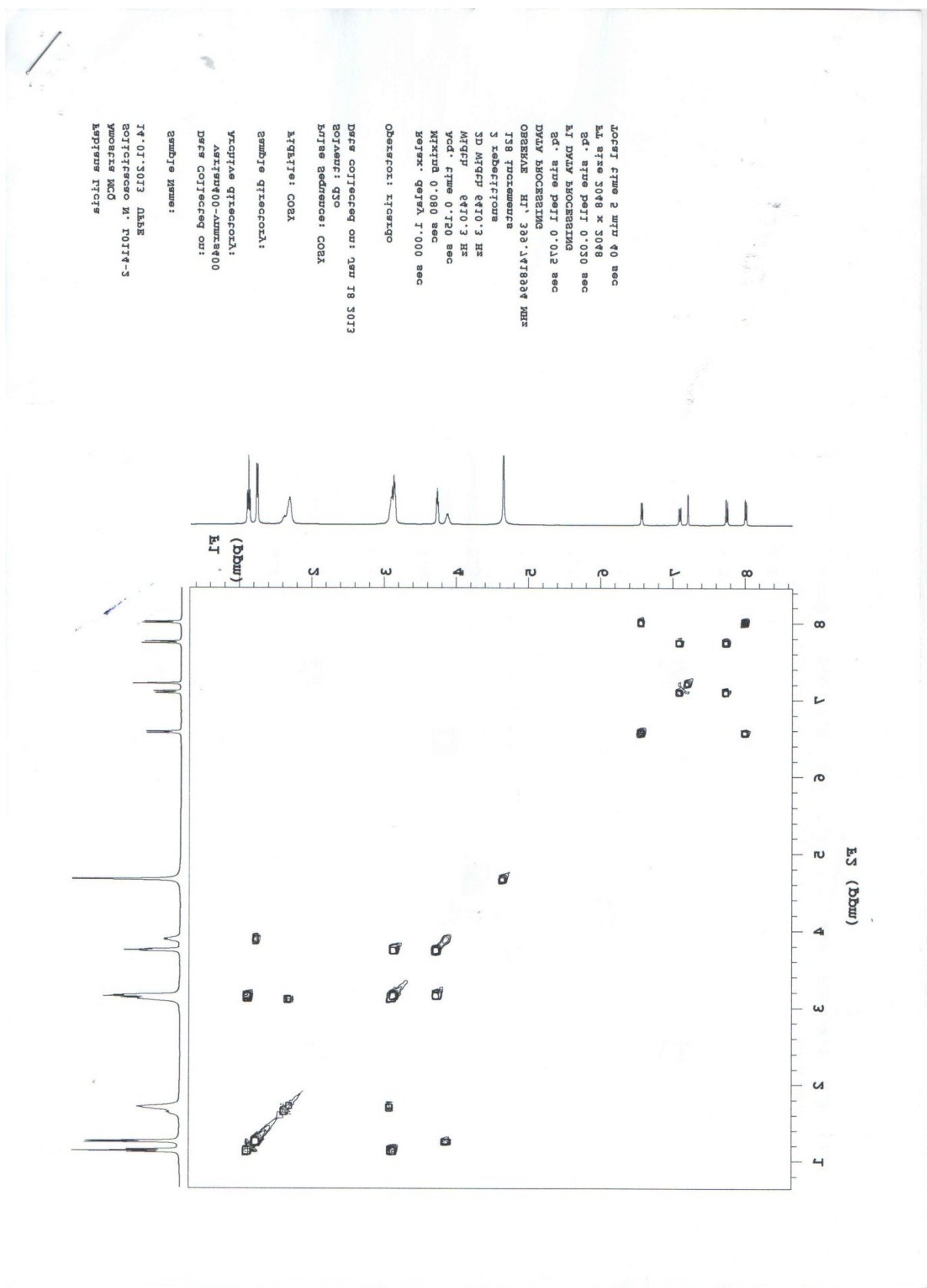
Indústria 0800 727 48 80

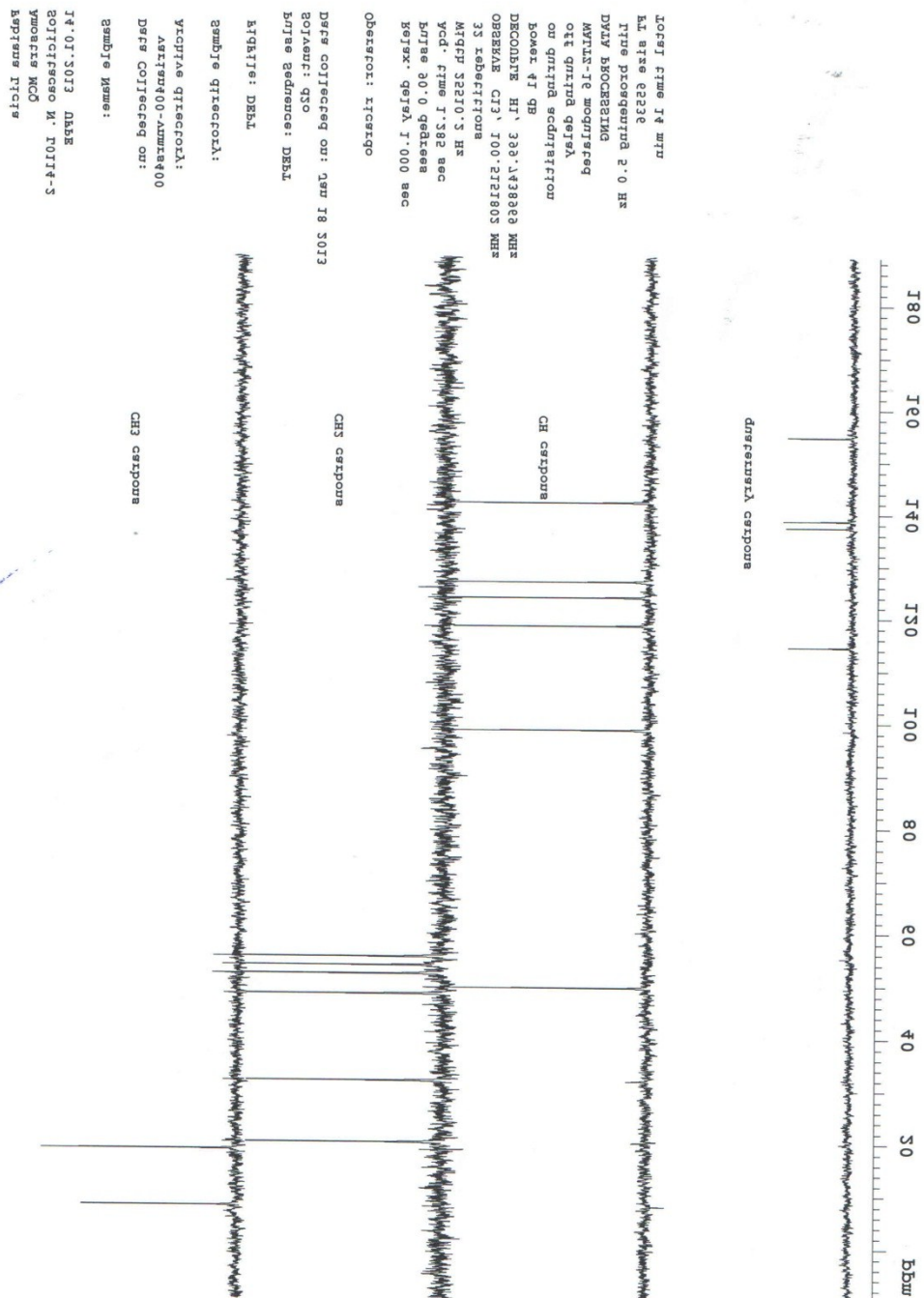
Matriz - RJ

Filial - SP

Filial - GO







23/4/2014

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

De: **Editor IJPSR** (editorijpsr@gmail.com)
 Enviada: quinta-feira, 17 de abril de 2014 17:42:48
 Para: **lrapha@hotmail.com**
 1 anexo
 Copy right form.pdf (263,7 KB)

Dear **Leslie R. M. Ferraz**

This is to acknowledge the receiving of your paper entitled '**Quality by design in the development and validation of analytical method by ultraviolet-visible spectrophotometry for quantification of hydroxychloroquine sulfate.**' Your article will be sent at the editorial board's desk for reviewing and after their comments it will be reverted back to you for correction if needed.

Kindly note your reference number- **IJPSR/RA-4158/04-14** and save this number for further correspondence. Selection of online publication of your manuscript totally depends upon the reviewing of the reviewer.

Selection of online publication of your manuscript totally depends upon the reviewing of the reviewer. You are requested to send the signed copyright form within 1-2 days. Please find Copy Right Form at our website www.ijpsr.com in **Instructions to Authors** section at end of the page and also attached with this e-mail.

Only after the copyright form is received duly signed by all author(s), your article will be forwarded for Reviewing Process to the Reviewer otherwise your article will not be considered for publication in IJPSR.

If you would like to receive **IJPSR updates**, you may follow us on Facebook <http://www.facebook.com/IJPSR>, Twitter <http://twitter.com/IJPSR> and Linked in.

Regards

Mrs. Monika Sabharwal
 Managing Editor
 IJPSR™ (ICV 2012 : 5.50)
 IJPSR is associated with ELSEVIER- Embase
 Citation in 2012 to articles Published in 2010 and 2011: 1365
 Article published in 2010 and 2011: 720
 Projected Impact Factor (2012) : 2.44
 DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232
 Member of International Linking Association, Inc (PILA) - USA
 *Citation source: [Google Scholar](http://www.google.com)
www.ijpsr.com

4/2/2014

#3400 Sumário

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Todos Pesquisar Busca Avançada

Home Arquivo Submissão Corpo Editorial Instruções Instructions Sobre

Home > Usuário > Autor > Submissões > #3400 > Resumo

#3400 Sumário

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

Submissão

Autores Leslie Raphael de Moura Ferraz, Fabiana Licia Araujo Santos, Ricardo Tadeu Lourenço Maia-Junior, Pablo de Ataíde Ferreira, Talita Atanazio Rosa, Larissa Araújo Rolim, Pedro José Rolim-Neto
Título ASPECTOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICOS E TECNOLÓGICOS DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA
Documento Original 3400-12688-1-SM.DOC 2014-02-04
Doc. Sup. 3400-12688-1-SP.PDF 2014-02-04 [INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR](#)
 3400-12688-1-SP.DOC 2014-02-04
Submetido por Pedro José Rolim-Neto
Data de submissão fevereiro 4, 2014 - 12:57
Seção Artigos de Revisão/Review Articles
Editor Nenhum(a) designado(a)

Situação

Situação Aguardando designação
Iniciado 2014-02-04
Última alteração 2014-02-04

Metadados da Submissão

EDITAR METADADOS

Autores

Nome Leslie Raphael de Moura Ferraz
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Aluno de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE
Contato Principal para correspondência
Nome Fabiana Licia Araujo Santos
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE
Nome Ricardo Tadeu Lourenço Maia-Junior
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Aluno de Iniciação Científica do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos do Departamento de Farmácia da UFPE
Nome Pablo de Ataíde Ferreira
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE
Nome Talita Atanazio Rosa
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil
Resumo da Biografia Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE
Nome Larissa Araújo Rolim
Instituição Universidade Federal do Vale do São Francisco
País Brasil
Resumo da Biografia Docente do curso de Farmácia e do programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semanário da Univasf
Nome Pedro José Rolim-Neto
Instituição Universidade Federal de Pernambuco
País Brasil

Quem é o Editor? Clique aqui para saber mais sobre a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em 1987 - primeira instituição em

http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/3400

Usuário

Logado como...
pedrorolim

[Meus periódicos](#)
[Perfil](#)
[Sair do Sistema](#)

Autor

Submissões
[Ativo \(4\)](#)
[Arquivo \(15\)](#)
[Nova Submissão](#)

Informações

[Para Leitores](#)
[Para Autores](#)
[Para Bibliotecários](#)
[Ajuda do Sistema](#)
[Sistema Eletrônico de Editoração de Revistas](#)



Esta obra está licenciada sob uma
Licença Creative Commons

1/2