



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA
ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA À BASE DO EXTRATO LIOFILIZADO
DE *Baccharis trimera* (LESS.) DC. E DO SULFATO DE
HIDROXICLOROQUINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA
PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE**

FABIANA LÍCIA ARAUJO DOS SANTOS

RECIFE

2015

FABIANA LÍCIA ARAUJO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA À BASE DO EXTRATO LIOFILIZADO DE *Baccharis trimera* (LESS.) DC. E DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE

2015

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

S237d Santos, Fabiana Lícia Araújo dos.

Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida associação em dose fixa à base do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e do sulfato de hidroxiclороquina como alternativa terapêutica para o tratamento da artrite reumatoide / Fabiana Lícia Araújo dos Santos. – 2015.

148 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.

Inclui referências e anexos.

1. Baccharis. 2. Hidroxiclороquina. 3. Liofilização. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-217)

FABIANA LÍCIA ARAUJO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA ASSOCIAÇÃO EM DOSE FIXA À BASE DO EXTRATO LIOFILIZADO DE *Baccharis trimera* (LESS.) DC. E DO SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 25/05/2015

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente e orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª Dr^ª. Maria Bernadete de Sousa Maia (examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Lariza Darlene Santos Alves (examinadora externa)
IDE cursos da Faculdade Redentor do Rio de Janeiro

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

Prof^ª. Dr^ª. Magaly Andreza Marques de Lyra (examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. 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

Ao meu presente divino,
Arthur.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir a realização de mais uma etapa importante na minha vida.

Ao meu orientador, que possibilitou a concretização desta tese, pelos exemplos de trabalho e inteligência, por sua compreensão, amizade e ensinamentos, **Professor Pedro Rolim**. Muito Obrigada!

À minha mãe, **Graça Araújo**, por seu amor, seus cuidados, e seu apoio incondicional. Mãe, você é a minha luz!

A toda minha família, em especial ao meu querido irmão **Fábio César** e a minha cunhada **Jaylla** por todo apoio e companheirismo.

Ao meu filho **Arthur**, pois sua existência é o meu maior estímulo e ao meu querido **Líbni Melo**, pelo apoio, confiança, carinho e amor. Amo vocês!

Ao **Laboratório de Tecnologia de Medicamentos - LTM** pela oportunidade de realizar este trabalho e a **todos os seus integrantes**. Em especial, a minha querida amiga, parceira e comadre **Magaly Andreza**, e também **Salvana, Camila Melo, Ádley, Francimary, Geisiane, Keyla e Rosali** pela amizade, companheirismo e boas risadas!

À equipe de trabalho “Carqueja” composta por **meu querido “filho” Leslie, Pablo, Larissa Lariza, Ricardo e Camila**. Muito obrigada! Este trabalho é fruto do nosso esforço.

Ao **Laboratório de Farmagognosia** na figura do **Prof. Dr. Haroldo Sátiro, Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares** que auxiliaram as análises fitoquímicas e a **Prof. Dra. Elba Lúcia** pela disponibilização de equipamentos e laboratório.

Ao Centro Pluri-disciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (UNICAMP) pela doação da matéria-prima vegetal.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilização de seus equipamentos e laboratório, especialmente a Adriana.

Aos departamentos de Química e Física da Universidade Federal de Pernambuco pela disponibilização de seus equipamentos e laboratórios, principalmente ao **Prof. Ricardo Oliveira**.

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste projeto, bem como pela bolsa de estudo fornecida para realização deste doutorado.

A **todos** que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Associação em Dose Fixa (ADF) é uma combinação de dois ou mais princípios ativos em uma razão fixa de doses em uma mesma forma farmacêutica. Comodidade para o paciente e consequente incremento na adesão ao tratamento são razões aventadas para estimular desenvolvimento de ADF, sendo estas particularmente importantes no tratamento de doenças crônicas. Assim, por associar atividade antiinflamatória, imunomoduladora e antiartrítica, *Baccharis trimera* (Less.) DC. é uma planta promissora para compor uma ADF com o sulfato de hidroxicloroquina (HCQ), como alternativa inovadora para o tratamento da artrite reumatoide. O sulfato de HCQ integra a relação de fármacos recomendados no consenso brasileiro de doenças reumáticas, podendo inclusive ser utilizado durante o período de amamentação. Sendo assim, o objetivo desse estudo é a obtenção de uma forma farmacêutica ADF (cápsulas), utilizando como agentes terapêuticos o extrato seco liofilizado de *B. trimera* e o fármaco sulfato de HCQ. O extrato foi obtido por infusão e seco por processo de liofilização, apresentando rendimento de 9% (p/p). A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada no ensaio de doseamento da droga vegetal e do extrato seco. As amostras apresentaram valores de 9 e 0,2 mg.g⁻¹ de ácidos cafeicos, respectivamente. A técnica de termogravimetria (TG) revelou a eficiência do processo de liofilização, uma vez que não foi observado na curva TG do extrato seco o evento de perda de água na faixa de 27-100°C, presente no perfil da droga vegetal. Em relação às propriedades de fluxo e tamanho de partícula, o extrato liofilizado apresentou-se como um pó fino, de elevada área superficial e presença de mesoporos, com baixa capacidade de fluxo, demonstrando a necessidade da adição de excipientes que possibilitem a utilização do insumo para a obtenção da forma farmacêutica. Na sequência, o sulfato de HCQ foi caracterizado por diversas técnicas, com destaque para a polarimetria, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de raios-X (DRX), comprovando a proporção equimolar dos isômeros da HCQ na mistura racêmica e a existência de cristais de tamanhos irregulares com formatos predominantemente hexagonais. A partir de um estudo de planejamento fatorial, otimizou-se o método analítico para doseamento do sulfato de HCQ por CLAE, com base na metodologia descrita na Farmacopeia Americana. O novo método provou ser mais rápido e mais eficiente em relação ao método de referência, por promover redução no tempo de retenção e redução no fluxo da fase móvel. Além disso, o método permitiu a quantificação do sulfato de HCQ a partir de um pico de alta resolução, apresentando valor de 1,087 para o fator de cauda, assegurando uma quantificação precisa da matéria-prima enquanto mistura racêmica. Através da obtenção de cinéticas de degradação dinâmica e isotérmica, o sulfato de HCQ revelou um prazo de validade estimado de 622 dias. A compatibilidade do fármaco-excipiente foi avaliada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC), seguida de análises complementares, evidenciando incompatibilidade do fármaco com o glicolato de amido sódico e com a lactose. Diante de todos os dados obtidos durante os estudos de pré-formulação, foi possível desenvolver uma forma farmacêutica ADF que apresentou boas propriedades de fluxo e baixo teor de umidade, situação ideal para manter a estabilidade de formulações que contém extrato de origem vegetal. Esse produto inovador pode surgir como um alívio ao desconforto do paciente que muitas vezes utiliza diferentes classes de medicamentos para o controle de doenças crônicas, como a artrite reumatoide.

Palavras-chave: *Baccharis*. Hidroxicloroquina. Liofilização.

ABSTRACT

Fixed-dose combination (FDC) is an association of two or more active ingredients in a fixed ratio of doses in the same pharmaceutical form. Convenience for the patient and consequent increase in treatment adherence are reasons to stimulate development of FDC, which are particularly important in the treatment of chronic diseases. Thus, by associating anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-arthritic activity, *Baccharis trimera* (Less.) DC is a promising plant to compose a FDC with hydroxychloroquine (HCQ) sulfate, as an innovative alternative for the treatment of rheumatoid arthritis. The HCQ sulfate integrates the list of drugs recommended in the Brazilian consensus of rheumatic diseases, and it can even be used during breastfeeding. Therefore, the aim of this study is to obtain a pharmaceutical form (capsules) of a FDC, using as therapeutic agents the dry extract of *B. trimera* and the drug HCQ sulfate. The extract was obtained by infusion and dried by lyophilization process, with yield of 9% (w / w). The high-performance liquid chromatography (HPLC) was used in the assay of the herbal drug and its dry extract. The samples exhibited values of 9 and 0.2 mg.g⁻¹ of caffeic acids, respectively. The thermogravimetry (TG) showed the efficiency of the lyophilization process, since it was not observed in the TG curve of the dry extract a water loss event from 27 to 100°C that is present in the herbal drug profile. Whereas flow properties and particle size, the lyophilized extract was characterized as a fine powder with a high surface area and the presence of mesopores, with low flowability, demonstrating the need for the addition of excipients that enable its use as an active pharmaceutical ingredient to obtaining the pharmaceutical form. Further, the HCQ sulfate was characterized by several techniques, especially polarimetry, Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray Diffraction (XRD), proving the equimolar ratio of the isomers of HCQ in the racemic mixture and the existence of irregular crystal sizes predominantly in hexagonal shapes. The analytical method for determination of HCQ sulfate by HPLC was also optimized using factorial design. The new method has proved to be faster and more efficient compared to the reference method described at United States Pharmacopeia, by promoting a reduction in the retention time and reducing the flow of mobile phase. Furthermore, the method allows the quantification of HCQ sulfate from a peak of high resolution, presenting value of 1.087 for the tailing factor, assuring a precise quantification of the raw material as the racemic mixture. By obtaining dynamic and isothermal kinetics of degradation, HCQ sulfate revealed an estimated shelf life of 622 days. The drug-excipient compatibility was evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), followed by complementary tests, highlighting drug incompatibility with sodium starch glycolate and lactose. Considering all the data obtained during the pre-formulation studies, it was possible to develop a FDC pharmaceutical dosage form which showed good flow properties and low moisture content, ideal situation to maintain the stability of formulations containing herbal extract. This innovative product may come as a relief to the discomfort of the patient who often uses different classes of drugs for the control of chronic diseases such as rheumatoid arthritis.

Keywords: *Baccharis*. Hydroxychloroquine. Freeze Drying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas da hidroxicloroquina, suas impurezas e produtos de degradação.....	47
Figura 2 - Provável rota degradativa do sulfato de hidroxicloroquina.	48
Figura 3 - Sítios de formação de diastereoisômeros do sulfato de hidroxicloroquina.	50
Figura 4 - Fluxograma para execução do estudo de compatibilidade.	69
Figura 5 - Cromatograma de identificação de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC. com os picos referentes a quercetina e 3-O-metil-quercetina, nos tempos de retenção (TR) de 14,7 e 15,1 min, respectivamente.	73
Figura 6 - Espectros de absorção da 3-O-metil-quercetina (A) e quercetina (B).....	74
Figura 7 - Histograma de distribuição granulométrica da droga vegetal <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	75
Figura 8 - Curva de calibração utilizada para cálculo dos teores de ácidos cafêicos.	76
Figura 9 - Perfil cromatográfico para ácidos cafêicos da droga vegetal de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	77
Figura 10 - Curvas de TG e DTG da droga vegetal e extrato seco por liofilização	78
Figura 11- Distribuição do tamanho de partículas do extrato liofilizado de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	81
Figura 12 - As curvas de sorção de umidade do extrato liofilizado de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	83
Figura 13 - (a) Espectro de absorção na região do infravermelho e (b) Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxicloroquina.....	86
Figura 14 - Espectro de Raman do sulfato de hidroxicloroquina.	87
Figura 15 - Espectro de massa da HCQ e estrutura química da hidroxicloroquina base livre.	89
Figura 16 - Comportamento higroscópico do sulfato de hidroxicloroquina em diferentes condições de umidade.....	92
Figura 17 - a) Capilares utilizados no fusiômetro; b) Curva DSC do sulfato de hidroxicloroquina.	94
Figura 18 - Difratoograma de raios-X do sulfato de hidroxicloroquina.....	95
Figura 19 - Micrografias de varredura do sulfato de hidroxicloroquina com aumentos de 300 e 750 vezes.	95

Figura 20 - Curva TG\DTG do sulfato de hidroxiclороquina.....	96
Figura 22 - Curva TG/DTG do sulfato de hidroxiclороquina ($\beta = 40 \text{ }^\circ/\text{min}$).....	97
Figura 23 - a) Repartição granulométrica; (b) tamanho médio de partícula do sulfato de hidroxiclороquina.	101
Figura 24 - 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.	105
Figura 25 - Cromatogramas do doseamento do sulfato de hidroxiclороquina pelo método farmacopeico (A) e pelo método otimizado (B).....	107
Figura 26 - a) Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade e b) Respectivo gráfico de dispersão.	108
Figura 27 - 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.	116
Figura 28 - Difractogramas do sulfato de hidroxiclороquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão sistemática de evidência da eficácia do sulfato de hidroxiclороquina no tratamento da artrite reumatoide e lúpus eritematoso (adaptado de OLSEN, 2013).....	38
Tabela 2 - Sistema de gradiente utilizado para as análises de identificação da droga vegetal .	54
Tabela 3 - Sistemas cromatográficos e reagentes empregados na prospecção fitoquímica do material vegetal seco de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC..	55
Tabela 4 - Gradiente de Fase móvel para doseamento de ácidos Cafêicos na amostra vegetal	56
Tabela 5 - Descrição dos parâmetros e níveis envolvidos no planejamento fatorial para otimização do método analítico de doseamento do sulfato de hidroxiclороquina.	67
Tabela 6 - Porcentagem dos componetes utilizados na formulação de cápsulas de extrato seco de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. e sulfato de hidroxiclороquina.	72
Tabela 7 - Perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	75
Tabela 8 - Equações de regressão, determinação dos limites de detecção e quantificação por CLAE dos ácidos cafêicos presentes do extrato liofilizado de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC..	79
Tabela 9 - Resultados de precisão para o método de quantificação de ácidos cafêicos presentes no extrato liofilizado de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	79
Tabela 10 - Propriedades reológicas do extrato seco de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC..	80
Tabela 11 - Solubilidade do extrato liofilizado de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC. em diferentes solventes.....	82
Tabela 12 - Correlação entre as bandas, tipos de vibração da ligação e seus respectivos grupos funcionais, obtido do espectrograma de infravermelho do sulfato de hidroxiclороquina.	85
Tabela 13 - Deslocamentos químicos de ¹³ C e ¹ H para o sulfato de hidroxiclороquina.....	88
Tabela 14 - Fragmentos da hidroxiclороquina base livre obtidos através de ionização do pico majoritário.	90
Tabela 15 - Solubilidade do sulfato de hidroxiclороquina em diferentes solventes e pH's.	91
Tabela 16 - Solubilidade do sulfato de hidroxiclороquina em diferentes solventes.	98
Tabela 17 - Porcentagem de sulfato de hidroxiclороquina dissolvida em soluções aquosas em diferentes pH's.....	99
Tabela 18 - Eficiência de dissolução para o sulfato de hidroxiclороquina nos tempos 5 e 30 minutos, em diferentes condições de pH.	100
Tabela 19 - Propriedades reológicas do sulfato de hidroxiclороquina.	101

Tabela 20 - Parâmetros avaliados pelo ensaio de adsorção de nitrogênio na determinação de superfície específica e tamanho de poro do sulfato de hidroxycloquina.	102
Tabela 21 - Matriz do planejamento fatorial 33 para otimização do método analítico de quantificação do sulfato de hidroxycloquina.	104
Tabela 22 - Análises do parâmetro precisão.....	108
Tabela 23 - Resultados obtidos para o parâmetro exatidão.	109
Tabela 24 - Temperatura inicial (Tonset), temperatura do pico (Tpico) e temperatura final (Tendset) do evento de fusão, variação da entalpia (ΔH), Temperatura de degradação (Tdeg) e perda de Massa do sulfato de HCQ e MB.	111
Tabela 25 - Cálculos dos parâmetros cinéticos do sulfato de hidroxycloquina isolado e das misturas binárias entre o fármaco e o glicolato de amido sódico a lactose.	114
Tabela 26 - Controles de qualidade dos lotes pilotos de cápsulas contendo extrato seco de B. trimera e sulfato de hidroxycloquina.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF	Associação em dose fixa
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês Acquired acquired immunodeficiency syndrome)
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
BDCQ	Bisdesetilcloroquina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQ	Cloroquina
COSY	Espectroscopia de correlação
DATAAN	(+)-di-O-acetil-L-tartárico
DCQ	Desetilcloroquina
DEPT	Intensificação sem distorção por transferência de polarização
DHCQ	Desetilhidroxicloroquina
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Diferencial
D2O	Água deuterada
Ea	Energia de Ativação
ED	Eficiência de dissolução
EM	Espectro de Massa
GAS	Glicolato de amido sódico
HCQ	Hidroxicloroquina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês Human Immunodeficiency Vírus)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
IMP	Impurezas

IUPAC	The International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
LA	Lactose
LC-DAD	Cromatografia Líquida acoplada a Detector de Arranjo Diodo
LD	Limite de detecção
LE	Lúpus eritematoso
LED	Lúpus eritematoso discoide
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LQ	Limite de quantificação
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MB	Mistura Binária
MS	Espectrometria de massas (do inglês Mass Spectrum)
n	Ordem de Reação
PD	Produtos de degradação
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
TG	Análise Termogravimétrica
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)
R-HCQ	Enantiômero R da Hidroxicloroquina
R-CQ	Enantiômero R da Cloroquina
S-HCQ	Enantiômero S da Hidroxicloroquina
S-CQ	Enantiômero S da Cloroquina
SS	Síndrome de Sjögren
TOF	Time of Flying
UR	Umidade relativa
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
ZDV	Zidovudina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
mg	miligramas
g	gramas
mL	mililitro
mm	milímetro
cm	centímetro
λ	comprimento de onda
Kg	quilogramas
μ g	microgramas
>	maior que
<	menor que
H	hidrogênio
C	carbono
k	constante de degradação de fármacos
K	constante de velocidade cinética
ΔH	variação de entalpia
T ₀	Temperatura inicial
T	Temperatura
t	Tempo
min	minutos
μ m	micrometro
°	graus
±	mais ou menos
J.g ⁻¹	Joule por gramas
Å	Angstrom
m/z	massa/carga
U%	Porcentagem de água adsorvida
Os	Peso do pesa-filtro contendo a amostra após da dessecação
Pu	Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação
Pa	Peso da amostra
dAP	Densidades aparente

dCP	Densidade compactação
FH	Fator de Hausner
IC	Índice de Carr
CV	coeficiente de variação
αD	rotação específica
ASC	área sob a curva do tempo
ATG	a área total do gráfico
cm ³ /g	Centímetros cúbicos por grama
p/p	Relação concentração Peso – peso
p/v	Relação concentração Peso – volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1. <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	26
3.2. Sulfato de hidroxiclороquina	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1. Caracterização da droga vegetal e padronização do extrato aquoso e seco por liofilização de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	53
4.1.1. Material Vegetal	53
4.1.2. Identificação química de B. trimera	53
4.1.3. Prospeção fitoquímica.....	54
4.1.4. Determinação da distribuição granulométrica da droga vegetal	55
4.1.5. Determinações de perda por dessecação e teor de cinzas totais da droga vegetal.....	56
4.1.6. Determinação de ácidos cafêicos da droga vegetal	56
4.1.7. Determinação do pH e densidade do extrato aquoso.....	57
4.1.8. Obtenção do extrato liofilizado	57
4.1.9. Caracterização térmica da droga vegetal e extrato liofilizado.....	58
4.1.10. Doseamento de Ácidos Cafêicos por CLAE no extrato liofilizado.....	58
4.1.11. Determinação da Reologia do extrato liofilizado	59
4.1.12. Determinação da área superficial e porosidade do extrato seco liofilizado	59
4.1.13. Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser do extrato seco liofilizado.....	60
4.1.14. Determinação da solubilidade do extrato seco liofilizado.....	60
4.1.15. Determinação da higroscopicidade do extrato seco liofilizado	60
4.2. Caracterização físico-química do fármaco antirreumático sulfato de hidroxiclороquina..	61
4.2.1. Material.....	61
4.2.2. Caracterização em nível molecular.....	61
4.2.3. Caracterização em nível de partículas	63
4.2.4. Caracterização em nível de aglomerados de partículas	65

4.2.5. Caracterização em nível de teor de água	66
4.2.6. Otimização de método analítico para doseamento do fármaco	67
4.3. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente do sulfato de hidroxiclороquina através de técnicas termoanalíticas.....	68
4.3.1. Material.....	68
4.3.2. Método de investigação da compatibilidade fármaco:excipientes	68
4.3.3. Estudo da cinética de degradação térmica do sulfato de HCQ e das MB	69
4.4. Obtenção da forma farmacêutica.....	70
4.4.1. Material.....	70
4.4.2. Desenvolvimento farmacotécnico das cápsulas	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1. Caracterização da droga vegetal e padronização do extrato aquoso e seco por liofilização de <i>Baccharis trimera</i> (LESS.) DC.....	73
5.1.1. Resultados obtidos a partir de análises da droga vegetal.....	73
5.1.2. Obtenção e controle do extrato aquoso.....	77
5.1.3. Obtenção do extrato seco liofilizado	77
5.1.4. Caracterização térmica da droga vegetal e extrato seco liofilizado.....	78
5.1.5. Resultados obtidos a partir de análises do extrato seco liofilizado	78
5.2. Caracterização físico-química do fármaco antirreumático sulfato de hidroxiclороquina..	84
5.2.1. Caracterização em nível molecular: Identificação química.....	84
5.2.2. Caracterização em nível de partículas	91
5.2.3. Caracterização em nível de aglomerados de partículas	100
5.2.4. Caracterização em nível de teor de água	102
5.2.5. Otimização de método analítico para doseamento do sulfato de hidroxiclороquina....	103
5.3. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente do sulfato de hidroxiclороquina através de técnicas termoanalíticas.....	109
5.4. Obtenção da forma farmacêutica.....	118
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	121

REFERÊNCIAS

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

Associação em Dose Fixa (ADF) é uma combinação de dois ou mais princípios ativos em uma razão fixa de doses em uma mesma forma farmacêutica (BRASIL, 2010). Comodidade para o paciente e consequente incremento na adesão ao tratamento são as razões aventadas para estimular desenvolvimento e uso de ADF, sendo particularmente importantes em tratamentos de longo prazo, como hipertensão e a artrite reumatoide (BORTOLOTTI, 2003).

A artrite reumatoide acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2002; CORBACHO, DAPUETO, 2010). Os custos relacionados a essa doença são elevados, o que decorre tanto de fatores diretos (gastos com diversos medicamentos, além de despesas médicas e hospitalares) quanto indiretos (perda da produtividade pessoal, absenteísmo e pagamento de aposentadorias por invalidez, para aqueles com perda total da capacidade laboral) (MOTA, et al., 2012).

Para o controle da dor e do processo inflamatório articular, característico da doença, o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES), associados ou não a doses baixas de glicocorticóides, é feito na terapêutica de base. Apesar da eficácia, o uso prolongado desses fármacos está relacionado a uma grande incidência de efeitos colaterais (BERTOLO et al., 2009).

Em adição a isso, as drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) são utilizadas para influenciar na progressão da doença, pois estes medicamentos, que variam de agentes antimaláricos, sais de ouro a agentes quimioterápicos, são efetivos em retardar a taxa de progressão radiográfica. Várias combinações de terapias com DMARDs provaram serem mais efetivas que a monoterapia (MONTEIRO; ZANINI, 2008).

Os antimaláricos vêm sendo usados no tratamento da artrite reumatóide há mais de 50 anos. São medicamentos seguros e eficazes, sobretudo para formas iniciais e leves. As duas formas disponíveis dos antimaláricos são o difosfato de cloroquina (DCQ) e sulfato de hidroxicloroquina (HCQ), das quais a última é preferível por seu melhor perfil de segurança, sobretudo oftalmológico, por esta última não ser capaz de cruzar a barreira sangue-retina (KLINGER et al, 2001).

O sulfato de HCQ integra a relação de fármacos recomendados no consenso brasileiro de doenças reumáticas, sendo classificada como uma DMARDs. Possibilitando, inclusive, o

tratamento de doenças reumáticas em pacientes gestantes, por não apresentarem efeitos teratogênicos em humanos nas doses recomendadas, além de sua permissão para utilização durante o período de amamentação (LEVI et al., 2005).

Tantos nos serviços de saúde públicos como nos privados, a associação metotrexato + DCQ/HCQ é a terapia combinada mais comumente utilizada. Entretanto, a severidade dos efeitos colaterais e o custo elevado do tratamento com o metotrexato são entraves à eficiência do tratamento (MOTA et al., 2012).

Neste contexto, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas simples, de custo reduzido e eficácia comprovada pode surgir como um alívio ao desconforto do paciente que muitas vezes utiliza diferentes classes de medicamentos, podendo estes provocar graves reações adversas.

Assim, por associar atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e antiartrítica com um efeito hepatoprotetor e antiulcerogênico relatados na literatura, *Baccharis trimera* (Less.) DC. é uma planta promissora para compor uma associação de um medicamento anti-inflamatório e imunomodulador com o sulfato de HCQ.

No Brasil, essa espécie é conhecida popularmente como “carqueja” e tem suas partes aéreas utilizadas na preparação de infusões, decocções e tinturas para o tratamento de doenças gastrointestinais, diabetes e processos inflamatórios (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Essas atividades biológicas motivaram a realização dos estudos fitoquímicos da planta, que demonstraram a presença de compostos bioativos, como flavonóides, diterpenos e triterpenos (PÁDUA et al., 2010).

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma associação em dose fixa entre o extrato seco por liofilização de *B. trimera* e do fármaco antirreumático sintético sulfato de HCQ, em um produto inovador eficaz, seguro e de custo reduzido, possibilitando um maior acesso da população ao tratamento da doença.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da artrite reumatoide, utilizando como agentes terapêuticos o extrato seco *B. trimera* e o fármaco sulfato de hidroxiclороquina.

2.2. Objetivos específicos

- Delineamento do perfil fitoquímico do infuso de *B. trimera*;
- Obter e caracterizar a droga vegetal e os extratos aquoso e liofilizado de *B. trimera*, em relação às propriedades físico-químicas;
- Validar método analítico para doseamento do extrato seco liofilizado de *B. trimera*;
- Caracterizar o sulfato de hidroxiclороquina, em relação às propriedades físico-químicas;
- Otimizar o método analítico para doseamento do sulfato de HCQ a partir da metodologia descrita na Farmacopeia Americana 2013;
- Realizar estudo de compatibilidade fármaco-excipientes, por meio das técnicas termoanalíticas;
- Desenvolver uma forma farmacêutica sólida (cápsulas) da associação do extrato liofilizado de *B. trimera* com o fármaco sulfato de hidroxiclороquina;

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Baccharis é o maior gênero da família Asteraceae, com mais de 500 espécies distribuídas pelos continentes Norte e Sul Americanos, sendo que 90% ocorrem na América do Sul. As espécies deste gênero estão distribuídas principalmente nas regiões temperadas e tropicais do Brasil, Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Chile e México (MARTINEZ; BESSA; BENITO, 2007).

Espécies desse gênero são importantes economicamente para o homem, pois ajudam no combate à erosão do solo e podem ser utilizadas como plantas ornamentais, embora também possam se apresentar como pragas de difícil combate em pastagens, podendo intoxicar o gado. Entretanto, o destaque maior está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente (CORRÊA, 1984; CARNEIRO; FERNANDES, 1996).

A origem do nome *Baccharis* (Bakkharis) é grega, utilizada como antiga denominação para algumas plantas arbustivas, e chegou a ser empregada para designar espécies que nada têm a ver com as que hoje em dia recebem este nome (BUDEL et al. 2005). São popularmente denominadas de “carqueja”, sendo indicadas tradicionalmente para o tratamento de distúrbios do sistema digestivo, embora haja outras diversas atividades biológicas relatadas (BELTRAME et al., 2009). Além de carqueja, apresenta ainda uma ampla variedade de nomes vulgares: carqueja-amarga, bacanta, bacorida, cacalia-amarga, carque, quina-de-condamine, vassoura, vassoura de botão e tiririca-de-babado e carqueja-doce (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

No Brasil, a espécie *Baccharis trimera* está inserida na Mata Atlântica, uma das florestas tropicais com maior diversidade biológica do planeta. Por esse motivo, intervenções científicas que busquem sua preservação e diminuição do extrativismo tornam-se necessárias. O estado do Paraná é considerado o centro de dispersão no país, mas sua ocorrência é destacada em Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (SOUSA, 2005).

A importância da espécie *B. trimera* para a medicina popular no Brasil incentivou a sua inclusão na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), como parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde brasileiro (MACEDO; GEMAL, 2009). Nesta lista, constam 71 espécies vegetais que

apresentam potencial terapêutico comprovado para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (RUIZ et al., 2008).

Nomenclatura

O conhecimento teórico sobre a nomenclatura e histologia vegetal é de fundamental importância para os profissionais que realizam o controle de qualidade destes produtos, permitindo a adequada análise e interpretação morfológica do material botânico utilizado no processamento para comercialização, contribuindo, consequentemente para o uso seguro destas plantas medicinais (ALVES et al., 2010).

Devido ao gênero *Baccharis* possuir aproximadamente 500 espécies, comparativamente há poucos trabalhos de morfoanatomia e de controle de qualidade envolvendo as mesmas, principalmente no que diz respeito ao Brasil que possui aproximadamente 120 espécies. É comum a confusão entre diferentes representantes de espécies de uso medicinais conhecidas pelo mesmo nome popular e utilizadas indiscriminadamente para a mesma finalidade terapêutica. A identificação botânica de algumas plantas oferece dificuldades até mesmo para especialistas como é o caso das *Baccharis* de caules alados, as carquejas (BUDEL et al., 2005).

Estas variações na nomenclatura foram citadas como forma de manter fidedignas as informações retiradas de textos originais que versam sobre a espécie em estudo, pois anteriormente muitos autores referiram-se à *Baccharis trimera*, como *Baccharis genistelloides*. Segundo Rosângela S. Biachini especialista do Jardim Botânico de São Paulo, os nomes *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. e *Baccharis trimera* (Less.) DC. são considerados sinônimos (BORELLA et al., 2006).

Aspectos botânicos

Quanto à descrição botânica, a *B. trimera* é um subarbusto glabro, glutinoso, ramificado; alas dos ramos com 0,5-1,5 cm de largura; com folhas muito reduzidas, ovais; capítulos, geralmente, aglomerados, formando espigas interrompidas, que se ordenam em inflorescências paniculiformes e com ramificações simples; involúcro do capítulo feminino com 5-6 mm de altura e 2-3 mm de diâmetro, corola tubulosa-filiforme, de borda truncada, denteada, provida de lígula curta, geralmente com estilete curto, com papilas estigmáticas

marginais; com 3-4 séries de brácteas involucrais glabras, agudas ou acuminadas; flores de 30-40, com corola de 3-4 mm de comprimento, com ápice truncado, envolvendo frouxamente o estilete; aquênio glabro, com 1-1,5 mm de comprimento, 10-estriados; estilete com 4-6 mm de comprimento; involúcro do capítulo masculino com cerca de 4-4,5 mm de altura e 5 mm de diâmetro, com brácteas involucrais ovadas, glabras; corola da flor masculina com 3,5-4 mm de comprimento, com limbo dividido em lacínios longos, enrolados em espiral. As flores masculinas, resultantes de atrofia, com consequente esterilidade do gineceu, são ordenadas num só capítulo ou em capítulos diferentes (SOUSA, 2005).

Possui folhas sésseis, obovadas, uninérveas, papiráceas, glabras e alternas, raramente opostas, desenvolvidas, escamiformes ou ausentes, lâminas lineares a ovadas, obovadas ou pinatissectas, margem inteira a denteada, glabras a glandular-punctuadas, ou glutinosas, raramente tomentosas a villosas (SCHNEIDER, 2009).

Normalmente são arbustos perenes de 50 cm a 4 m de altura. Na região sudoeste do Brasil, existem aproximadamente 120 espécies. A grande concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que toda essa área é o provável centro de origem do táxon (BUDEL et al., 2005). Ocorre em campos secos a úmidos, bordas de matas e ambientes alterados, onde pode formar populações densas. Ocorre em altitudes entre 100 a 1800, podendo chegar a 2500 metros acima do mar, na Bolívia (MÜLLER, 2006).

Com a finalidade de se obter dados que auxiliassem na diferenciação e consequentemente na identificação das mesmas, contribuindo para o controle de qualidade de fitoterápicos, além de auxiliar na caracterização do grupo taxonômico; deve-se estudar a morfologia externa e a anatomia dos cladódios das espécies. A *B. trimera* apresenta alas mais largas e interrompidas. Tais características morfológicas permitem a diferenciação entre as espécies, principalmente os tricomas tectores (BUDEL & DUARTE, 2009).

A propagação da carqueja pode ser feita por sementes, estacas ou divisão de touceiras (CASTRO; FERREIRA, 2000). Deve haver um espaçamento de 30x30 cm entre plantas. A espécie pode ser cultivada em regiões com até 800 metros de altitude, adaptando-se bem a vários tipos de solo, crescendo abundantemente em regiões de campos e pastagens em todo o País. Recomenda-se uma adubação com esterco de gado, esterco de aves e composto orgânico, quando necessário. A colheita dos ramos deve ser realizada antes da floração, cortando-se a 10 cm da superfície do solo para permitir a rebrota. Não se recomenda ramos com mais de 7 mm de espessura para comercialização. Os ramos devem ser picados para facilitar a secagem (VAZ; JORGE et al., 2006).

O enraizamento da *B. trimera* de uma estaca de aproximadamente 20 cm, apresenta altos níveis de brotação e um desenvolvimento de um sistema radical. (BONA et al., 2004). Este processo pode ser influenciado por diversos fatores internos e externos à planta, tais como a influência do substrato, da posição da estaca na planta e do sexo da planta matriz no enraizamento de estacas (CARVALHO et al., 2007).

A melhor época de plantio da carqueja é recomendada para os meses de setembro e outubro com um espaçamento entre plantas de 0,4 m a 0,8 m. A cultura deve ser renovada a cada três ou quatro anos.

No que se diz respeito à coleta da carqueja, dá-se no seu estágio vegetativo (primavera) a 15 cm, duas a três vezes ao ano, o que minimizaria os danos às plantas. O sistema subterrâneo horizontal da carqueja é formado por raízes gemíferas, capazes de gerar novas plantas a partir da ativação de gemas dormentes (SCHEFFER-BASSO et al., 2008).

Os compostos de destaque no gênero *Baccharis* são diterpenóides, embora sejam outros componentes biologicamente ativos, por exemplo, compostos fenólicos e óleos essenciais, que têm sido relatados nos últimos anos (MARTINEZ; BESSA; BENITO, 2007).

Composição química

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início de 1900. Cerca de 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente e entre estas, em torno de 30 apresentam estudos de atividade biológica (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005), sendo que mais de 150 compostos foram isolados e identificados a partir deste gênero (MARTINEZ; BESSA; BENITO, 2007).

Os compostos mais importantes em *Baccharis* são os diterpenóides, e são representados principalmente por neo e ent-clerodanos e, menos comum, ent-labdanos e kauranos. Os flavonóides, juntamente com os diterpenos, são os compostos de maior ocorrência no gênero *Baccharis* e são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos para os mais baixos níveis hierárquicos da família Asteraceae. Apresentam-se normalmente como agliconas livres e muito raramente na forma glicosilada, o que é uma característica da família Asteraceae (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Dentre as espécies do gênero *Baccharis*, a *B. trimera* é a que apresenta o maior número de estudos fitoquímicos e farmacológicos (BELTRAME et al., 2010). Nessa, estudos

químicos revelaram a presença de diterpenos do tipo clerodano, saponinas e de seus glicosídeos, e flavonóides (SILVA et al., 2007).

No que se refere aos flavonóides, uma série deles já foram isolados: eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, apigenina, hispidulina, eupatorina, genkwanina, cirsimarina, rutina, cirsiolol, canferol, eupatrina, eriodictiol, 5-OH-6,7,3',4'-OMe flavona, 5,7,3',4'-OH-3-O-ramnosil-glicosil flavona (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005) e a 5,6-diidroxí-7,3',4'-trimetoxiflavona (BORELLA et al., 2006). Deve-se ressaltar que grande parte das ações farmacológicas citadas para esta espécie se deve a este complexo flavonoídico presente na composição química, e que o teor desses sofre influência da sazonalidade, sendo sua concentração maior no verão. No que se referem as substâncias afro gênicas, como as saponinas, observou-se que estas não há influência da biossíntese desse tipo de metabólito na *B. trimera* (BORELLA et al., 2006).

Os derivados do ácido quínico estão presentes em uma variedade de espécies vegetais (TIMMERMAN et al., 1983; BASNET et al., 1996; CHUDA et al., 1996) e são responsáveis por um grande número de atividades farmacológicas. Deste grupo de compostos citados, estão presentes na espécie *Baccharis trimera* L. os ácidos 5-O-cafeoilquínico 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,5-O-dicafeoilquínico e o 4,5-O-dicafeoilquínico (SIMÕES-PIRES et al., 2005). E como componentes majoritários do extrato aquoso, esses compostos justificam seu uso popular por apresentar as atividades antioxidante (CHUDA et al., 1996), hepatoprotetora (BASNET et al., 1996), antibacteriana (SHOLZ; HEINRICH; HUNKLER, 1994), anti-inflamatória (GONGORA, 2002), e antiviral (MATSINGOU et al., 2000).

Os óleos essenciais de 38 espécies deste gênero já foram analisados, representando em muitos casos, o valor dessas plantas na medicina tradicional como diurético e estomáquico. Devido às suas propriedades amargas estes óleos são também frequentemente usados para preparar bebidas alcoólicas ou não alcoólicas (RETTA et al., 2009).

Em estudo realizado por Silva et al. (2007), observou-se que o rendimento médio anual de óleos essenciais de *B. trimera* foi maior em amostras selvagens do que em plantas cultivadas. Trabalhos anteriores indicaram que adubo orgânico e químico (AMARAL et al., 2010), assim como a sombra não modificam significativamente o rendimento de óleo essencial, mas a radiação aumenta o teor de óleos essenciais em cultivo de carqueja (BONA et al., 2004). Dessa forma, ambas as populações analisadas apresentaram dinâmica sazonal semelhante na produção de óleo essencial, sendo encontrado valor mais baixo durante o inverno seco (SILVA et al., 2007).

Posteriormente, Silva (2010), avaliou a influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja. Através desse estudo, verificou-se que o armazenamento da droga pulverizada reduz significativamente o teor de óleo essencial, o que não aconteceu na droga fragmentada. Os teores dos constituintes majoritários espatulenol e ledol não são influenciados pelo tratamento pós-colheita, embora possa haver variações distintas redução nas concentrações de ledol e aumento nos teores de espatulenol. Logo, verificou-se que as drogas fragmentadas podem ser armazenadas por até 12 meses e pulverizadas no momento da extração, não conferindo redução no teor de óleo essencial, nem dos constituintes químicos. Paralelamente, o armazenamento a -6 °C por até oito meses, provocou variações quantitativas em alguns constituintes minoritários, tais como a-guaieno, b-selineno, germacreno B e espatulenol.

Por sua vez, o estudo realizado por Simões-Pires et al. (2005) avaliou por CG e CG/MS os óleos essenciais extraídos de várias espécies do gênero *Baccharis* (*B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *milleflora Baccharis*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* e *B. Usteri*). Apesar da semelhança morfológica entre estas espécies, as diferenças na composição do seu óleo essencial puderam ser observadas. Todas as amostras de *B. trimera*, mesmo quando coletadas em diferentes locais do sul do Brasil, apresentaram um composto incomum em outras espécies, o acetato de carquejol (35,5 - 68,0%). Também foi observada a presença de ledol (5,9 – 24,2%), que é um composto raramente encontrado nas concentrações observadas. Ambos os compostos citados foram obtidos consistentemente no material coletado durante todo o ano. Diante do resultado apresentado, o acetato de carquejol foi sugerido como marcador da *B. trimera* pelos autores.

Em relação aos marcadores, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., os de identificação de *B. trimera* são a quercetina e a 3-O-metil-quercetina. O doseamento é feito em relação a ácidos cafeícos totais expresso na forma de ácido clorogênico.

Estudos farmacológicos

B. trimera é uma espécie vegetal extremamente usada na medicina popular como antiinflamatório, antidiarréico, anti-hipertensivo, antibacteriano, antireumático, analgésico (BORELLA & FONTOURA, 2002). Na literatura, diversos autores avaliam essas propriedades em diferentes modelos experimentais

O extrato hidroetanólico de *B. trimera* reduziu a liberação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Demonstrando seu grande potencial antioxidante (PÁDUA et al., 2010).

Em um estudo comparativo de extratos brutos aquosos e etanólicos de espécies do Gênero *Baccharis* (OLIVEIRA et. al., 2011) demonstraram o potencial antioxidante frente a vários modelos pré-clínicos, como inibição de mieloperoxidase e peroxidação lipídica. O extrato aquoso de *B. trimera* foi o mais efetivo em inibir a oxidação pela mieloperoxidase. Em relação à peroxidação lipídica, os extratos aquosos foram os que obtiveram melhores resultados, quando comparados com os etanólicos. O extrato aquoso de *Baccharis trimera* inibiu efetivamente esta reação frente a outras duas espécies do mesmo gênero.

O efeito antiartrítico do extrato aquoso da *Baccharis genistelloides* var. *trimera*, preparado a 3,3% (p/v) por infusão, foi demonstrado em modelo de artrite induzida por colágeno *in vivo*. Os resultados demonstraram uma redução drástica do desenvolvimento da doença com diminuição da migração, ativação e proliferação de linfócitos para o local da lesão (COELHO et al., 2004).

Em modelos pré-clínicos de inflamação em ratos, pleurisia induzida por carragenina, o extrato aquoso de *B. trimera* apresentou ação antiinflamatória. Os extratos nas concentrações de 400 e 800 mg/Kg causaram efeitos inibitórios significantes tanto no influxo de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares), como no aumento de exsudato na cavidade pleural. Efeito imunomodulador foi avaliado em modelo de proliferação, *in vitro*, de linfócito T. Os extratos de *B. trimera* nas concentrações 25, 50 e 100 mg/mL reduziram significativamente a produção dessas células frente à fitohemaglutinina (PAUL et. al., 2009).

A atividade anti-inflamatória de *B. trimera* foi avaliada por modelo de edema de pata usando vários agentes flogísticos. Os resultados mostraram que a fração butanólica do extrato aquoso (40 a 100 mg/kg) inibiu marcadamente a inflamação induzida por carragenina e dextrana. O efeito analgésico foi avaliado através do modelo de contrações abdominais por ácido acético, onde o extrato reduziu consideravelmente o número de contrações abdominais (GENÉ, 1996).

Paul e colaboradores (2009) sugerem que a ação antiinflamatória do extrato aquoso de *B. trimera* L. está associado à diminuição da migração de células pró-inflamatória, como os neutrófilos. Esta atividade também estaria, em parte, relacionada à inibição de síntese de prostaglandinas, por bloqueio da ação da enzima cicloxigenase. Entretanto, a identificação de diferentes tipos de flavonóides (quercetina, rutina, hispidulina, luteolina, apigenina e

nepetina), saponinas e diterpenos sugerem que as atividades imunomoduladora e antiinflamatória das preparações com a *B. trimera* L. resultam do somatório dos diferentes mecanismos de ação dos componetes bioativos da planta.

A ação citoprotetora dos extratos aquoso, etanólico, diclorometânico e hexânico de *Baccharis genistelloides* var. *trimera* foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados indicaram que o extrato hexânico promoveu citoproteção gástrica, inibindo as úlceras em 64,3% enquanto o extrato aquoso inibiu em 52,8%, ambos comparados à inibição de 85,7% do controle (Atropina) (GONZALES et al., 2000).

Em relação ao efeito anti-hiperglicemiante do extrato da carqueja, estudos com camundongos, com diabetes induzida por estreptozotocina, tratados durante 7 dias, duas vezes ao dia (2000 mg/Kg) com a fração aquosa do extrato etanólico de *B. trimera*, demonstraram efeito anti-hiperglicemiante relevante (OLIVEIRA et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2005). Resultado semelhante ao obtido por Coelho et al. (2004), que trataram ratos saudáveis com o extrato aquoso de *B. genistelloides* (4,2 mg/Kg, 37dias) e observaram uma redução não apenas na glicemia, mas também nos níveis séricos de triglicérides (COELHO et al., 2004).

A atividade hepatoprotetora foi avaliada em modelo de intoxicação por faloidina em camundongos, substância tóxica extraída da *Amanita phalloides* capaz de causar injúria ao sistema nefrohepático. Avaliou-se a capacidade do extrato bruto (acetato de etila), uma fração enriquecida, flavonóides isolados (quercetina, luteolina, apigenina, nepetina, hispidulina) e uma mistura entre eles, aumentar ou não a sobrevida dos animais tratados. Foi observado que o flavonóide hispidulina (32 mg/Kg) conseguiu aumentar a sobrevida dos animais em 80 %, sendo que a mistura de flavonóides, em proporções iguais, obteve 70%. O extrato bruto e a fração enriquecida aumentaram a sobrevida dos animais dose-dependente em até 100% (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987)

O extrato aquoso das partes aéreas da carqueja diminuiu a produção de ácido gástrico e inibiu a indução de lesões por estresse ou por etanol em ratos, além de um diterpeno identificado e isolado desta mesma espécie possuir a capacidade de relaxar a musculatura lisa intestinal de ratos (TORRES et al., 2000).

Gamberini e colaboradores, em 1991, comprovaram cientificamente a ação antidiarréica e espasmolítica utilizada popularmente, pois, constataram que o extrato aquoso de *B. trimera* reduziu significativamente o trânsito intestinal de ratos e camundongos. Além disso, observou-se uma redução da secreção ácida no estômago e no aparecimento de lesões gástricas, respaldando seu uso popular como antidiarréico e antiácido.

Muitos pesquisadores demonstraram a ação antimicrobiana da *B. trimera* frente a vários microorganismos, como Schmidt e colaboradores (2008) que comprovaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *B. trimera* sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Bacillus subtilis*. Extratos apolares de *B. trimera* (hexano e diclorometano) apresentaram atividade antimicrobiana com 57% das bactérias Gram-positivas e 46% das Gram-negativas testadas (BORGES et al., 2007). Bem como, o decocto de *B. trimera* apresentou atividade anti-séptica e bactericida contra isolados de bactérias Gram-positivas e negativas *in vitro* (AVANCINI et al., 2000). Em 2010, Taschetto, determinou atividade *in vitro* do extrato etanólico de *B. trimera* contra *Helicobacter pylori*. Neste estudo foram comparadas duas espécies do mesmo gênero *Baccharis*, a *Baccharis articulata* e a *B. trimera*, sendo a *B. trimera* mais eficiente no efeito antimicrobiano.

O extrato aquoso de *B. genistelloides* demonstrou efeito antiviral contra os vírus do herpes simples tipo 1 e de estomatite vesicular (ABAD et al., 1999).

As lactonas sesquiterpênicas presentes na carqueja apresentaram atividade inibitória contra *Schistosoma mansoni* e *Tripanossoma cruzii* (ALONSO, 1998).

Para a espécie vegetal *B. trimera* são atribuídas muitas atividades biológicas, sendo os principais grupos responsáveis por tais ações nesta espécie: os flavonóides, um complexo de saponinas, tendo como substância majoritária o ácido equinocístico, terpenos menores, como mono, di e sesquiterpenos, triterpenos, e alguns derivados cinâmicos. Muitos autores atribuem às atividades biológicas de uma espécie vegetal a um único grupo químico de substâncias, porém, é cada vez mais evidente a complexidade de avaliar quais metabólitos apresentam o real efeito biológico, pois alguns metabólitos que apresentam estruturas químicas diferentes têm atividades semelhantes ou sinérgicas. Podendo o particionamento e isolamento de extratos e substâncias vir a produzir falsos resultados.

Estudos toxicológicos

Apesar do uso terapêutico das plantas medicinais e de seus produtos (chás e tinturas), em certos casos, elas podem se tornar um problema, pois algumas das substâncias que as compõem podem desencadear efeitos deletérios que resultam em um quadro clínico severo, algumas vezes, fatal.

Quanto a sua toxicidade, em doses usuais e durante períodos de tempo prolongado, diversos estudos demonstraram que extratos de *B. trimera* apresentam poucos efeitos adversos ou tóxicos quando comparado às outras plantas terapêuticas também utilizadas com frequência pela população.

O principal efeito tóxico relatado para *B. genistelloides* é a indução de aborto, relatada popularmente e comprovada experimentalmente em animais, sendo atribuída a uma ação uterotônica (RUIZ et al., 2008).

Na literatura também é possível encontrar diversos estudos minuciosos de avaliação do potencial citotóxico do infuso de *B. trimera* sobre as células das raízes de *Allium cepa*. A dose usual do chá de carqueja (20 g/L) aumentou o número de anomalias do ciclo mitótico das células, já a dose dez vezes mais concentrada (200 g/L), inibiu a divisão celular, caracterizando efeitos mutagênicos e antiproliferativos. Ainda neste estudo, a avaliação do efeito do infuso sobre linfócitos humanos evidenciou a ocorrência de aberrações cromossômicas dose-dependente, levando os autores a recomendar moderação no consumo do chá de carqueja (PINHO et al., 2010).

Losqui e colaboradores (2009) verificaram, também, que a carqueja possui ação inibitória na diferenciação de células neuronais *in vitro* quando tratadas cronicamente. Observou também uma redução na sobrevivência de células neuronais e diminuição da proliferação de células gliais. Essa redução da proliferação de células da glia poderia estar interferindo na sobrevivência e diferenciação neuronal.

Estudos conferem aos taninos presentes na espécie a atividade enzimática responsável pela inibição da divisão celular de *Allium cepa*. Estas espécies também contêm flavonoides, os quais têm demonstrado possuir atividade citotóxica (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Entretanto, Peron e colaboradores (2008) verificaram que a infusão de carqueja em doses extrapoladas das usadas pelos humanos, não foram citotóxica e nem clastogênica em células da medula óssea de ratos Wistar e segundo Rodrigues (2009) não foram observados efeitos genotóxicos sobre as células sanguíneas e hepáticas de ratos que receberam as doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg durante três dias consecutivos.

Estudos de toxicidade aguda e dose repetida em ratos (machos e fêmeas), com diferentes doses de extrato aquoso obtido por infusão, indicaram a ausência de alterações significativas do perfil hematológico assim como dos marcadores de funções hepática e renal, tais como transaminases e creatinina. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal, aspecto, cor e peso relativo do fígado, rins, timo e

pulmões entre os grupos que receberam o extrato (PEDRAZZI et al., 1997; COELHO et al., 2004). Outro estudo em ratos demonstrou a atividade hipotensora do extrato de carqueja, não se recomendando, assim, o consumo por pacientes hipotensos (ALONSO et al., 2009).

3.2. Sulfato de hidroxicloroquina

Desenvolvido inicialmente como agente antimalárico, o sulfato de HCQ – quimicamente (7-cloro-4-[4-[N-etil-N-(2-hidroxietil)-amino]-1-metilbutilamino]-quinolina sulfato – 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 et al., 1989).

Como antimalárico, a hidroxicloroquina (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).

A HCQ tem sido ainda 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 discoide (LD), sarcoidose, síndrome de Sjögren (SS) e doenças de fotossensibilidade (SHAPIRO; GOLDBERG, 2006).

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 sobrevivência 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).

Aspectos clínicos

O sulfato de HCQ traz benefícios em longo prazo no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico e da artrite reumatoide e tornou-se um componente padrão de terapia para pacientes com estas doenças.

O mecanismo de ação desse fármaco envolve a inibição da interação antígeno-anticorpo, a inibição da síntese de interleucina-1 (IL-1) e da degradação da cartilagem induzida por esta citocina, além de inibir as funções lisossomais dos fagócitos e dos macrófagos (BONFANTE et al., 2008).

A tabela 1 apresenta 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 hidroxiclороquina no tratamento da artrite reumatoide e lúpus eritematoso (adaptado de OLSEN, 2013).

Enfermidade	Avaliação da eficácia	Tipo de evidência	Referência
Artrite reumatoide	Contagem de edema 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., 2005.
	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

Relatos apontam a eficácia da HCQ em doenças diferentes daquelas que apresentam condições reumáticas. Alguns desses relatos estão descritos a seguir (OLSEN et al., 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).

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 seis semanas. Esses resultados sugerem que há uma redução não só da incidência de diabetes tipo dois 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 e 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 ET AL., 1984; JOHANSSON et al., 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 et al., 1982; JOHANSSON et al., 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 & 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 (SACHET et al., 2007).

Talvez o fator mais inesperado 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 et al., 2013; SPERBER et al., 1997).

Paton e Aboulhab (2005) em um estudo recente 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 et al., 2007; Savarino et al., 2001; CHIANG et al., 1996).

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; TUFFANELLI, 1980).

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 e Sorsby reconheceram pela primeira vez a toxicidade retiniana associada ao uso de hidroxiquina (WEINBERG; D'AMICO, 1994; HOBBS; SORSBY, 1959).

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 (RAINES et al, 1989; ELMAN et al., 1976; HOBBS et al., 1961; HENKIND; ROTHFIELD, 1963).

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).

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).

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).

A utilização do fármaco em questão é segura durante a gravidez, pois a molécula de HCQ é grande e não é capaz de 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., 2010; IZMIRLY et al., 2012; LEVY, 2005; Costedoat-Chalumeau et al., 2005).

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) estereoseletivo(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, PASUTTO; JAMALI, 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) estereoseletivo(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., 1993; MCLACHLAN et al., 1994; 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; PASUTTO; JAMALI, 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 et al., 1992).

Deve-se esperar o acúmulo do fármaco e seus metabólitos, quando em dosagens crônicas. O composto possui longo tempo de 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). Estudos atuais são capazes de mensurar esse parâmetro farmacocinético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sangue total (COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2006; TETT et al., 1989; TANENBAUM; DENNY; TUFFANELLI, 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 & 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 & 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, foram evidenciados sete casos em uma revisão da literatura médica realizada por Marquardt e colaboradores (2001). Entretanto, ainda não há harmonização do tratamento dessa situação.

Aspectos Tecnológicos

Ao se escolher uma molécula de fármaco para desenvolver novas alternativas terapêuticas seguras e eficazes, é importante reunir informações em relação às características intrínsecas da molécula.

Em relação ao sulfato de HCQ, Semeniuk & colaboradores (2008) evidenciaram, por técnicas de cristalografia e difração de raios-X, a projeção da estrutura cristalina e interações intermoleculares do monocrystal do fármaco. 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).

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. A solubilidade do sulfato de HCQ é de $2,61.10^{-2}$ g/L, sendo portanto classificado como praticamente insolúvel, segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (UNIVERSITY OF ALBERTA, 2013; BRASIL, 2010; SWEETANA; AKERS, 1996).

Muito pouco se conhece sobre a estabilidade e outras informações do campo da tecnologia farmacêutica acerca do fármaco sulfato de HCQ. Oficialmente, nos compêndios britânico e americano, não há menção sobre a estabilidade da hidroxicloroquina no que diz respeito a impurezas e produtos de degradação (PD) (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008; USP, 2010). 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). Após apenas 5 horas de exposição, a amostra irradiada em isopropanol apresentou cromatograma representado pela figura 1, evidenciando quatro diferentes impurezas (IMP): IMP-2 (desetil-HCQ), IMP-3 (N-desidroxietil-HCQ), IMP-4 (dímero de HCQ) e IMP-5 (desamina-HCQ).

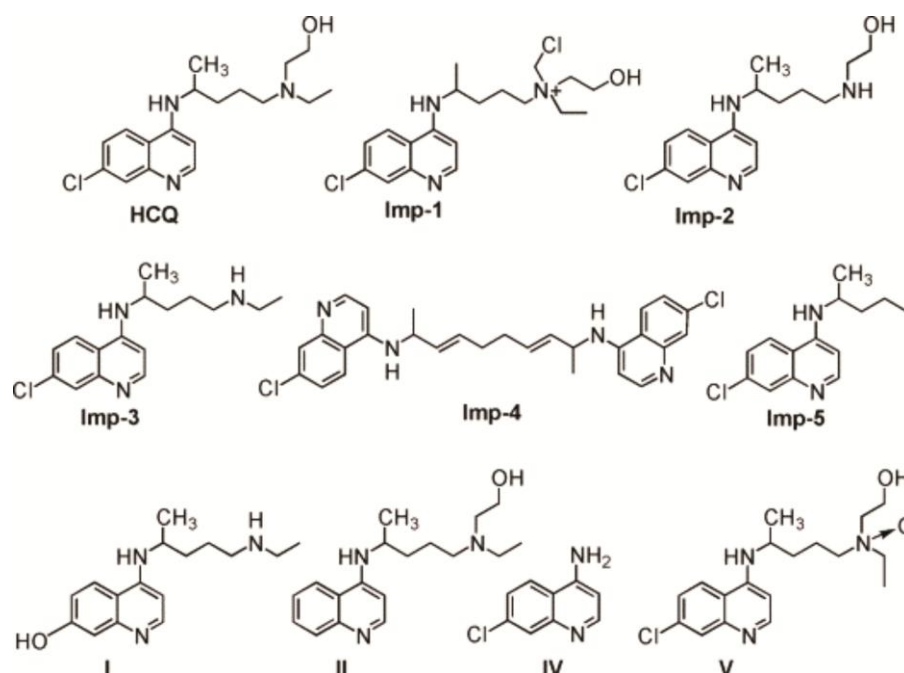
Mais tarde, Dongre & colaboradores (2009) realizaram a identificação e caracterização de duas impurezas relacionadas à síntese do fármaco: a já citada IMP-2 e a IMP-1 (HCQ-N-quaternária). A identificação e caracterização das substâncias foi possível apenas pelo uso de técnicas hifenizadas, como CLAE-IT-MS 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. 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.

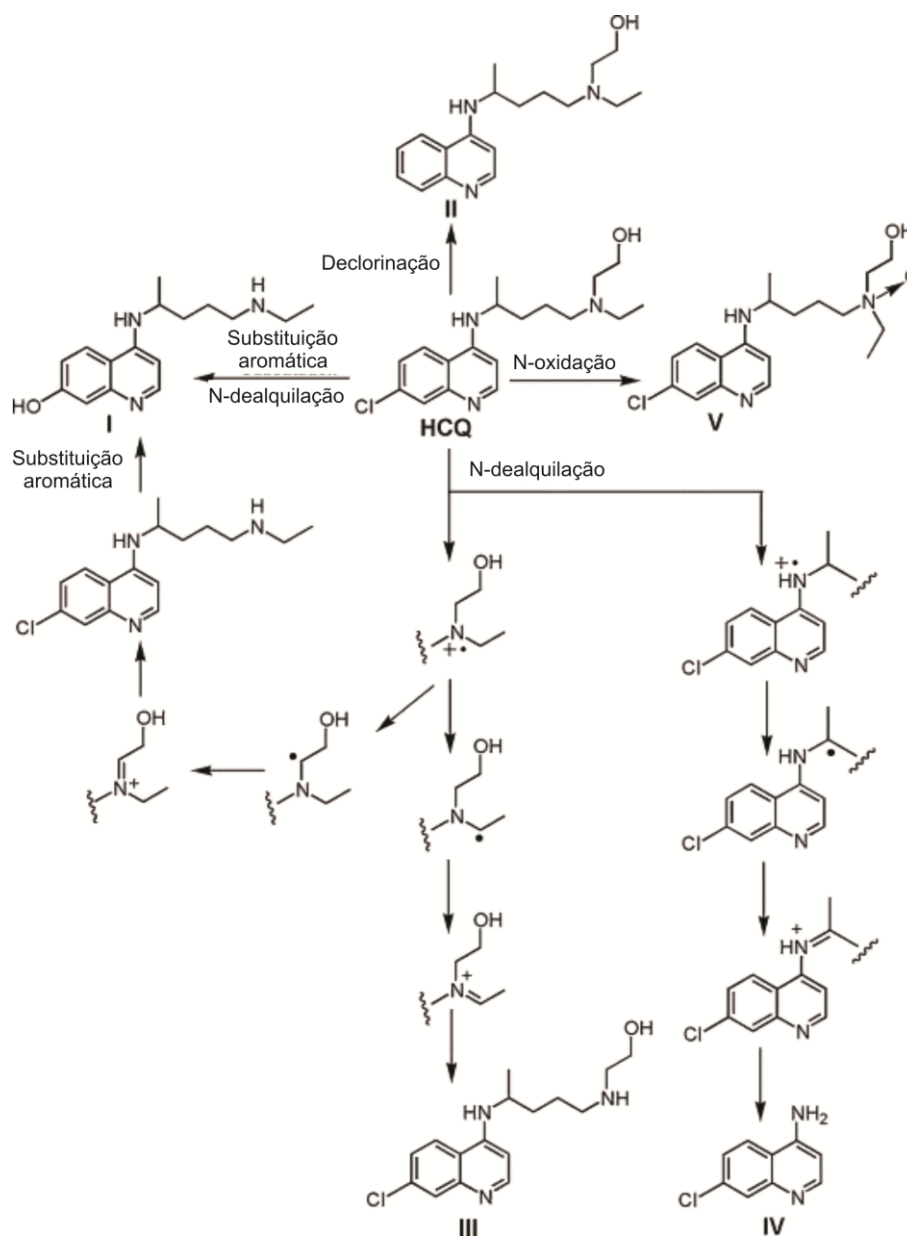
Praticamente todas as condições propostas apresentaram a estabilidade do fármaco, exceto a solução alcalina mantida nas condições de fotólise. Esta apresentou 6 produtos de degradação (figura 1), 4 inéditos (I-IV) e 2 semelhantes as estruturas de impurezas já conhecidas. Os autores evidenciaram que os 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.

Figura 1 - Estruturas da hidroxicloroquina, suas impurezas e produtos de degradação (adaptado de Saini e Bansal, 2013).



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 2), bem como as características de estabilidade intrínseca ao fármaco.

Figura 2 - Provável rota degradativa do sulfato de hidroxicloroquina.



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 (CALDWELL, 1995; CALDWELL, 1996; LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001; CARDOSO, 2006).

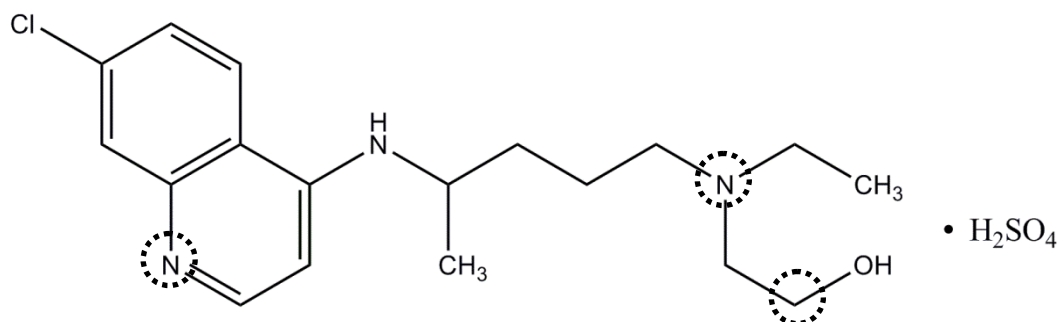
Faz-se então necessário melhor esclarecimento sobre as propriedades físico-químicas e perfis estereosseletivos – cinéticos e dinâmicos – de fármacos quirais. Por essa razão, fármacos já comercializados como racematos vêm sendo resgatados em exaustivos estudos buscando avaliar se há vantagem em se produzir o fármaco em seu enantiômero puro mais efetivo e/ou eficaz (CALDWELL, 1995; CARDOSO, 2006).

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; VERLEYSEN; SANDRA, 1998).

Grande parte dos estudos de separação enantiomérica, até então, têm sido desenvolvida empregando técnicas de eletroforese capilar e, mais comumente, a 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 3 (DONGRE et al., 2009; CARDOSO, 2006).

Figura 3 - 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 et al., 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 enantioseparação (SINGH; KEDOR-HACKMANN; SANTORO, et al., 2006; CARDOSO, 2006; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; MCLACHLAN et al., 1993; 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 microssomas de fígado humano, *in vitro*, produzindo enantiômeros opticamente puros de metabólitos, subsequentemente utilizados como padrão.

No caso da HCQ, a mistura racêmica 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; IREDALE et al., 1992; 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. As amostras compreendem: preparações farmacêuticas, urina, plasma e sangue total.

Outra forma de avaliar a estabilidade de um fármaco é a termodegradação. Frequentemente é capaz de ser mensurada através de termogravimetria, técnica que permite 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). Entretanto, não há, atualmente, informações na literatura que abordam o comportamento térmico e a estabilidade da forma sólida do sulfato de HCQ.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da droga vegetal e padronização do extrato aquoso e seco por liofilização de *Baccharis trimera* (LESS.) DC.

4.1.1. Material Vegetal

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas na manhã do dia 20 de janeiro de 2011, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil, segundo as coordenadas geográficas: latitude 22° 47' 29.29" S e longitude 47° 6' 31.80" W. O material fresco foi aspergido com álcool etílico a 70%, e em seguida seco em estufa de ar circulante durante cinco dias à temperatura de 40°C. Após secagem, o material foi triturado em moinho de facas (Apado[®]), com malha de 30 mesh.

A identificação do material vegetal foi realizada pelo Centro Pluri-disciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (UNICAMP), sendo a exsicata depositada encontrada no herbário da mesma instituição, localizada na cidade de Paulínea-SP, sob número 1286.

4.1.2. Identificação química de *B. trimera*

O ensaio de identificação por CLAE foi baseado no método de Borgo et al. (2010) e de Mello e Petrovick (2000). A partir deste, realizaram-se adaptações do gradiente da fase móvel, que possibilitaram a identificação dos marcadores 3-O-metil-quercetina e quercetina na droga vegetal.

Para preparação da solução mãe, pesou-se cerca de 1 g da droga pulverizada e colocou-se em balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de metenamina (0,5% p/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Realizou-se aquecimento em banho-maria, sob refluxo, durante 30 min. Após resfriamento, filtrou-se a mistura em algodão para balão volumétrico de 100 mL. Repetiu-se a operação retornando novamente o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, adicionando-se 20 mL de acetona e aquecendo sob refluxo, durante 10 min. Filtrou-se em algodão para o mesmo balão volumétrico de 100 mL. Repetindo-se a etapa anterior (algodão + 20 mL acetona + refluxo). Após a última filtragem, o material foi resfriado à temperatura ambiente, ajustou-se o volume para 100 mL com acetona. Em funil de separação, tratou-se 20 mL desta

solução com 20 mL de água e extraiu-se com 15 mL de acetato de etila, repetindo-se por três vezes, com porções 10 mL de acetato de etila.

As frações de acetato de etila foram reunidas, e em seguida, foram lavadas com duas porções de 50 mL água, transferindo posteriormente a fração de acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetato de etila.

A análise foi realizada em cromatógrafo de alta eficiência Shimadzu® com sistema controlador (Shimadzu SCL - 20VP), bombas (Shimadzu LC - 20AD VP), detector PDA (SPDM20AVP), auto-injetor (Shimadzu SIL - 20AD VP), forno (Shimadzu CTO - 20A) e os cromatogramas foram determinados através do programa LC – Solution® 1.0. Foram utilizadas as seguintes condições analíticas: coluna fase reversa Shimadzu® C18 (250 x 4,6 mm) de tamanho de partícula de 5 µm; sistema de fase móvel A (água:ácido acético 95,5:4,5v/v) e B (acetonitrila 100%), com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL; λ=325 nm.

O sistema gradiente utilizado nas análises das amostras está descrito abaixo (tabela 2).

Tabela 2 - Sistema de gradiente utilizado para as análises de identificação da droga vegetal de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. por CLAE.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,01	85	15
15	40	60
18	0	100
21	0	100
24	85	15

4.1.3. Prospecção fitoquímica

Para obtenção da amostra para análise fitoquímica, o material vegetal seco foi submetido à infusão aquosa durante 45 min a 3,3% (p/v). Posteriormente, o material obtido foi resfriado e filtrado a vácuo. O infuso foi particionado seguidamente em acetato de etila e n-butanol. Aliquotas destas frações (cerca de 15 µL) foram submetidas à prospecção

fitoquímica efetuada por cromatografia em camada delgada (CCD) usando-se placas de gel de sílica para cromatografia (Macherey-Nagel®). Os reagentes utilizados na caracterização dos principais grupos metabólitos secundários e padrões representativos destes grupos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Sistemas cromatográficos e reagentes empregados na prospecção fitoquímica do material vegetal seco de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

Classe de Metabólito	Sistema de eluição	Revelador	Referência
Alcalóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Cumarina	Éter – Tolueno – AcOH 10% ²	UV (365nm)	Wagner e Bladt (1996)
Derivados Cinâmicos	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	NEU	Wagner e Bladt (1996) NEU (1956)
Flavonóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O ¹	NEU	Wagner e Bladt (1996) NEU (1956)
Taninos hidrolisáveis	n-BuOH - H ₂ O – AcOH ³	NEU	Xavier (2002)
Triterpenos / Esteróides	Tolueno – AcOEt ⁴	LB	Harborne (1998)

Legenda: ¹ 100:11:11:27 v/v; ² 50:50:50 v/v; ³ 40:50:10 v/v; ⁴ 90:10 v/v; AcOEt = Acetato de etila, HCOOH = Ácido Fórmico, H₂O= água, UV= ultravioleta, NEU = ácido etilborilaminoestér a 1% em metanol, n-BuOH = n-butanol, LB = Lieberman e Burchard.

Adicionalmente, para a identificação de saponinas foi efetuado o teste de afrogenicidade que consiste na vigorosa agitação das soluções obtidas durante 1 min, seguido de repouso. A presença de espuma abundante e persistente após 15 min de repouso foi o critério usado para confirmar a presença de saponosídeos (COSTA, 2010). O tempo de observação da altura da espuma persistente foi estendido por 2 h após o repouso.

4.1.4. Determinação da distribuição granulométrica da droga vegetal

Para a determinação da distribuição do tamanho das partículas foram utilizados 25 g da amostra e equipamento tamizador Bertel®. O ensaio foi realizado em triplicata e seguiu metodologia descrita pelos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). Foram utilizados tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poro (850, 600, 425, 250, 150, 90) (BRASIL, 2010). Os dados foram analisados por método

gráfico, construindo-se histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

4.1.5. Determinações de perda por dessecação e teor de cinzas totais da droga vegetal

A análise foi realizada em triplicata utilizando três pesa-filtros chatos, previamente dessecados por 30 min nas mesmas condições do teste. Foi adicionado cerca de 1 g da droga vegetal. Os pesa-filtros com as amostras foram levados à estufa à temperatura de 105°C por período de 2 h, sendo posteriormente resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados. O procedimento foi repetido até peso constante (BRASIL, 2010).

A quantificação do resíduo não volátil do pó de *B. trimera* foi obtida em triplicata pela determinação de cinzas totais (BRASIL, 2010), sendo os cadinhos previamente calcinados em mufla e então resfriados e pesados. A eles foram adicionados cerca de 3 g de pó da droga seca, sendo as amostras carbonizadas em bico de Bunsen e, posteriormente, incineradas em mufla a 500°C até peso constante.

4.1.6. Determinação de ácidos cafêicos da droga vegetal

O método utilizado para doseamento de ácidos na droga vegetal seguiu metodologia descrita por Ferreira (2012).

As condições cromatográficas no ensaio de doseamento da droga vegetal foram detector ultravioleta a 325 nm, coluna C18 (250 x 4,6 mm) de 5 µm, mantida a temperatura ambiente; fluxo da fase móvel de 0,6 mL/minuto. Fase móvel em gradiente, composta de eluente A (acetonitrila, água e ácido trifluoracético, na proporção de 5:95:0,05) e eluente B (acetonitrila) com volume de injeção de 10 µL (Tabela 4).

Tabela 4 - Gradiente de Fase móvel para doseamento de ácidos Cafêicos na amostra vegetal de *Baccharis trimera* (Less.) DC..

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0-40	100→57	0→43	Gradiente linear
40-45	57→0	43→100	Gradiente linear
45-50	0→100	100→0	Gradiente linear
50-60	100	0	isocrática

As soluções-amostra foram obtidas pesando-se 1 g da droga seca e moída em béquer de 50 mL, adicionaram-se 10 mL de mistura de etanol e água (50:50) e foram submetidas a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora com agitação constante por 10 minutos. O extrato obtido foi resfriado à 25°C e filtrado em algodão (50 mg) para balão volumétrico de 50 mL. O resíduo da droga retido no algodão foi extraído novamente com 10 mL de mistura de etanol e água (50:50), e o processo repetido novamente. As duas alíquotas de cerca de 10 mL foram colocadas no balão de 50 mL e completou-se o volume com mistura de etanol e água (50:50). Desta solução-mãe foram retiradas alíquotas de 1,2 mL as quais foram diluídas em soluções de 10 mL (volumétrico) do eluente A da fase móvel, obtendo-se uma solução amostra de $2,4 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Para determinação da concentração de ácidos caféicos foi construída uma curva de calibração com ácido clorogênico padrão (Sigma Aldrich, pureza de 99%) a partir de uma solução mãe de $1,12 \text{ mg.mL}^{-1}$. A curva analítica foi construída com as concentrações de 336, 224, 112, 84, 56, 28 e $11,2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O resultado do doseamento foi expresso em gramas de ácido clorogênico por 100 g da droga (%), considerando a perda por dessecação.

4.1.7. Determinação do pH e densidade do extrato aquoso

A obtenção do extrato de *B. trimera* foi realizado de acordo com Coelho et al. (2004), visando a atividade antiartrítica evidenciada, associado as atividades anti-inflamatória e analgésica também descritas por outros autores (PAUL et al., 2009; GENÉ et al., 1996). Realizou-se uma infusão aquosa da droga vegetal seca na proporção 3,3% (p/v). Como controle de qualidade desta etapa do processo foram avaliados o pH e a densidade do extrato aquoso.

4.1.8. Obtenção do extrato liofilizado

A obtenção do extrato seco de *B. trimera* realizou-se através do extrato aquoso, anteriormente descrito, que foi congelado em ultrafreezer a $-90^\circ \pm 5^\circ\text{C}$ por 24 h, e posteriormente liofilizado (Liotop[®]) sob pressão de $24 \mu\text{mm}$ de Hg; vácuo $220 \pm 2 \text{ Vca.}$ por 96 h. O produto foi acondicionado em frasco-ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

4.1.9. Caracterização térmica da droga vegetal e extrato liofilizado

As curvas de termogravimetria (TG) da droga vegetal foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras em torno de 6 mg ($\pm 0,5$), acondicionadas em cadinho de alumina, nas razões de aquecimento 10°C.min⁻¹, até 700°C. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS® (Thermal Analysis) versão 2.20 da Shimadzu®.

4.1.10. Doseamento de Ácidos Cafêicos por CLAE no extrato liofilizado

O doseamento do extrato liofilizado procedeu com as mesmas condições cromatográficas adaptadas para a droga vegetal, com modificação no preparo da amostra. A solução-amostra de extrato liofilizado foi obtida a partir de uma solução mãe de 100 mg de extrato liofilizado para balão de 100 mL em água, obtendo-se uma solução de concentração de 1 mg.mL⁻¹.

O método por CLAE foi validado para a análise quantitativa do 5-CQA, 3,4-diCQA e 4,5-diCQA de acordo com as normas da RDC 899/2003 (ANVISA), adotando os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e robustez. A linearidade foi avaliada pelo cálculo da regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. A precisão foi avaliada pela análise do ponto médio da solução extrativa, em sextuplicata, no mesmo dia e pela análise desse mesmo extrato duas vezes em dois dias diferentes, feito por dois diferentes analistas (precisão intra-dia e inter-dias). Especificidade foi verificada por determinação da recuperação do 5-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA em três diferentes concentrações e pelo cálculo do desvio padrão relativo (coeficiente de variância). O mesmo foi realizado para o extrato contaminado com o padrão do material vegetal. A seletividade foi determinada através da observação da pureza de todos os picos, devido à utilização de um detector DAD. LD e LQ foram calculados através do quociente entre o desvio padrão do coeficiente linear de três curvas de calibração obtidas para o teste da linearidade; e a média dos *slopes* das curvas obtidas multiplicado por três e dez, respectivamente. A robustez foi avaliada modificando o tipo de agitação visando a obtenção da solução extrativa. Três

diferentes tipos de agitação foram aplicados: agitação manual, agitação magnética e sonicação, através do equipamento Sonicator Limp Sonico®.

Para avaliar se há diferenças entre os tipos de agitação, a comparação entre as médias foi realizada utilizando ANOVA *one-way*. Todos os tratamentos foram realizados com um intervalo de confiança de 95%.

4.1.11. Determinação da Reologia do extrato liofilizado

A densidade compactada foi determinada através de ensaio com 10 g do extrato seco 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 (dAP) e de compactação (dCP). A compressibilidade do pó foi avaliada através do Fator de Hausner (FH) e o Índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes equações: $FH = dCP/dAP$ e $IC (\%) = (dCP - dAP)/dCP \times 100$, respectivamente (WELLS, 2005).

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 (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

4.1.12. Determinação da área superficial e porosidade do extrato seco liofilizado

A área superficial específica foi obtida através de adsorção física de nitrogênio sobre o pó da matéria-prima, pelo método Brunauer-Emmett-teller (BET) (1938). Utilizou-se analisador de área superficial ASAP 2440 Micrometrics®, munido de software SBET. Foram pesados aproximadamente 200 mg do extrato liofilizado previamente tratado a 100°C por 5 h, em estufa, para otimização do processo de adsorção e posteriormente a mostra foi submetida a degaseificação por 48 horas a 110°C.

4.1.13. Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser do extrato seco liofilizado

Foi utilizado um analisador de tamanho de partícula Microtac[®] S3500. As amostras foram dispersas em álcool isopropílico na proporção 1:2 (mg.mL⁻¹). Esta dispersão foi agitada no banho ultrassônico Unique[®] mod. USC-1400^a, com potência ultrassônica 135 Watts, durante 3 minutos antes de ser analisada. Cada análise foi realizada em triplicata.

A técnica utilizada baseia-se em que a luz, ao interagir com a matéria particulada, pode ser espalhada (mudança de direção) sem sofrer alteração de sua energia (espalhamento Rayleigh). Este espalhamento é função do tamanho da partícula. Portanto, a distribuição do tamanho de partículas pode ser determinada pela análise do espalhamento de luz produzido. O equipamento Microtrac[®] S3500 emprega um sistema de três lasers operando em conjunto com um arranjo de fotodetecção que varre ângulos de espalhamento unificado da luz (UST – Unified Scatter Technique).

4.1.14. Determinação da solubilidade do extrato seco liofilizado

Para avaliação da solubilidade, pesou-se cerca de 10 mg do extrato liofilizado, transferindo-o para um erlenmeyer. Adicionou-se, lentamente, os solventes testados (água destilada, metanol, etanol, HCl e NaOH 0,1M e solução de lauril sulfato de sódio a 1%) até completa solubilização visual. Quando não houve solubilização, mesmo após o volume final de 50 mL do solvente, submeteu-se às amostras a sonicação por 15 min. Persistindo a não solubilização, adicionou-se o volume de 25 mL do solvente até completa solubilização, submetendo as amostras a sonicação. Ao final da adição do total de 100 mL, o ensaio foi finalizado (BRASIL, 2010).

4.1.15. Determinação da higroscopicidade do extrato seco liofilizado

Para determinar a estabilidade dos extratos secos frente à umidade relativa (UR) do ambiente em que se encontram, foram seguidas técnicas adaptadas de Lemos Senna e colaboradores (1997) e De Souza e colaboradores (2000).

Amostras de 0,5 g, em quadruplicata, foram acondicionadas em pesa-filtros e mantidas em dessecador, garantindo a saturação de UR constante, em temperatura ambiente. Em

seguida, as amostras foram submetidas à exposição de diferentes condições de UR: 28, 74 e 95%, utilizando sílica e soluções salinas de cloreto de sódio e sulfato de zinco, 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 porcentagem de água absorvida (% U) foi calculada em relação ao peso, em gramas, da amostra seca (Ps) e úmida (Pu), através da equação 1: (Eq.1) $U = [(Pu - Ps) / Ps * 100]$.

4.2. Caracterização físico-química do fármaco antirreumático sulfato de hidroxiclороquina

4.2.1. 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.

4.2.2. Caracterização em nível molecular

4.2.2.1. Ensaio semiquantitativo de solubilidade

O ensaio de solubilidade semiquantitativo do sulfato de HCQ foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, onde um grama do fármaco foi submetido aos seguintes solventes: água e solução aquosa de tampão fostato em diferentes pHs, acetona, álcool etílico, álcool metílico, álcool isopropílico e acetona.

4.2.2.2. 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 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.

4.2.2.3. Espectroscopia de Massa (EM)

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.

4.2.2.4. 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).

4.2.2.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN- ^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY e DEPT) foram obtidos em espectrômetro Varian® Unity Plus 400 MHz para H e 100 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em água deuterada (D_2O).

4.2.3. Caracterização em nível de partículas

4.2.3.1. 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 porcentagem de água adsorvida (U%) foi calculada em relação ao peso, em gramas, da amostra seca (Ps) e úmida (Pu), através da equação 1.

$$\text{Equação 1. } "U\%=" \frac{(Pu-Ps)}{Ps} \times 100$$

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

A curvas DSC do sulfato de HCQ 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. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4.2.3.3. 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.

4.2.3.4. 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.

4.2.3.5. 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°.min⁻¹, na faixa do ângulo 2θ de 5° - 45°.

4.2.3.6. 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 mL.min⁻¹, sendo a massa da amostra cerca de 5 mg (± 0,05) para o sulfato de HCQ, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600°C na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco.

4.2.3.7. Ensaio quantitativo de solubilidade

A solubilidade do fármaco foi avaliada em solventes orgânicos, meios aquosos e em diferentes pHs. A quantificação foi realizada por meio de método otimizado no presente estudo, por CLAE-DAD (item 4.2.5.4). 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.

4.2.3.8. Simulação de 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 de doseamento otimizado no presente estudo e utilização de soluções aquosas em diferentes pH's como meio de dissolução. A ideia foi 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 otimizado durante o desenvolvimento desse trabalho (item 4.2.5.4).

4.2.4. Caracterização em nível de aglomerados de partículas

4.2.4.1. Descrição e tamanho de partícula

A matéria-prima foi visualizada macroscopicamente, para verificação do aspecto e cor. Para a determinação da distribuição do tamanho das partículas do sulfato de HCQ seguiu-se metodologia descrita anteriormente (item 4.1.4). Foram utilizados tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poro (600, 500, 250, 150, 90, 44 μm) (BRASIL, 2010).

4.2.4.2. Propriedades de fluxo

A avaliação da reologia do sulfato de hidroxyclorequina foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita no item 4.1.11.

4.2.4.3. Área superficial e tamanho de poro

A área superficial específica foi obtida foi utilizado o método Brunauer-Emmett-teller (BET) (1938), descrito previamente no item 4.1.12. 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.

4.2.5. Caracterização em nível de teor de água

4.2.5.1. 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 2, 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.

$$\text{Equação 2. } \% = \frac{(P_u - P_s)}{P_a} \times 100$$

4.2.5.2. Balança de IV

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 peso constante. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.5.3. 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).

4.2.6. 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.

Para a otimização do método analítico, foi proposto um planejamento fatorial 3^3 , realizando mudanças na concentração da composição de fase móvel, no fluxo e na temperatura do forno (Tabela 5). O valor do fator de cauda foi utilizado 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.

Em seguida, o método foi covalidado a partir da obtenção dos resultados dos parâmetros: linearidade, repetitividade, precisão intermediária e exatidão.

Os dados experimentais das 27 análises e do planejamento foram processados utilizando o software marca Shimadzu® Solution LC 1.0 e software Statistica® versão 8.0 (StatSoft®, Tulsa, USA), respectivamente. Os resultados da validação foram tratados por meio do teste *t* de Student, e ANOVA *One-way Two-way*.

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

Tabela 5 - Descrição dos parâmetros e níveis envolvidos no planejamento fatorial para otimização do método analítico de doseamento do sulfato de hidroxycloquina.

Parâmetros	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Proporção de fase móvel	70:30	80:20	90:10
(USP-MP:MeOH)	v/v	v/v	v/v
Fluxo de fase móvel	0,8 mL	1 mL	1,2 mL
Temperatura do forno	30°C	35°C	45°C

Preparo da solução-padrão

Em primeiro lugar, preparou-se uma solução do padrão analítico do sulfato de HCQ em metanol e água (1:1 v/v), a fim de se obter uma concentração de 1 mg.mL⁻¹. Uma alíquota desta solução foi diluída em fase móvel USP até atingir a concentração de 0,05 mg.mL⁻¹.

Preparo da solução-amostra

A fim de obter uma solução de 1 mg.mL^{-1} , o sulfato de HCQ foi dissolvido em metanol e água (1:1 v/ v) e mantidos em agitação em, durante 15 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada até à temperatura ambiente e uma alíquota foi diluída em fase móvel USP até atingir a concentração de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$.

4.3. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente do sulfato de hidroxicloroquina através de técnicas termoanalíticas

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 200, talco, polivinilpirrolidona (PVP) K-30, croscarmellose sódica, Starch® (amido parcialmente pregelatinizado), estearato de magnésio, polietilenoglicol (PEG) 4000, glicolato de amido sódico (GAS), lactose anidra (LA), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Polyox® (Polioxirano).

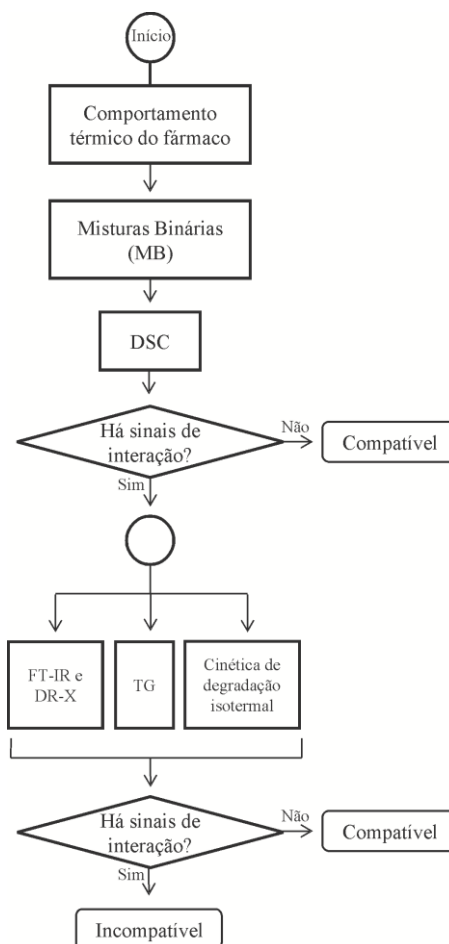
As MB 1:1 (p/p) do sulfato de HCQ com os excipientes foram preparadas utilizando almofariz e pistilo, triturando a mistura durante 3 minutos cada. As amostras foram armazenadas em frascos-ampola.

4.3.2. Método de investigação da compatibilidade fármaco:excipientes

O fluxograma apresentado na figura 4 apresenta o protocolo utilizado para a realização do estudo de compatibilidade. Foram realizadas análises da curva DSC do sulfato de HCQ isolado e deste em MB. Os valores referentes à temperatura inicial de fusão (Ti) 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.

Todas as análises foram realizadas conforme metodologias descritas na parte experimental 4.2. Para as análises de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria, utilizou-se o dobro da massa da mistura binária em relação à massa do fármaco.

Figura 4 - Fluxograma para execução do estudo de compatibilidade.



4.3.3. 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 previamente descrita no item 4.2.3.6; 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 softwares 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 $10 \pm 0,5\%$

4.4. Obtenção da forma farmacêutica

4.4.1. Material

Para o desenvolvimento da forma farmacêutica, foi utilizado extrato seco liofilizado de *B. trimeia L.* obtido de acordo com o item 4.1.7 deste trabalho. O sulfato de HCQ foi adquirido da FAGRON[®] do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX#7 e sintetizado pela indústria Sanofi-Aventis[®]. Os excipientes utilizados foram celulose microcristalina 200 (lote 145012388, Microcel[®]), amido parcialmente pregelatinizado (lote 16910, Starch[®]), estearato de Magnésio (lote 255971#6, Magnesia GM[®]), dióxido de silício coloidal (lote 3158071326, Degussa[®]) e talco (lote N-800623, Magnesia GM[®]). Os equipamentos de produção utilizados foram: Balança semianalítica (Shimadzu[®]), Misturador em “V” e Encapsuladeira manual (Multilabor[®]).

4.4.2. Desenvolvimento farmacotécnico das cápsulas

Para obtenção da forma farmacêutica com propriedades anti-inflamatórias e antiartrítica do extrato seco de *B. trimera L.* e a atividade imunomoduladora do sulfato de HCQ, as cápsulas foram planejadas para conter 20 mg do extrato liofilizado de *B. trimera* e 200 mg do sulfato de HCQ.

A concentração do extrato na formulação foi determinada através do “Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers” (FDA, 2002). A partir da dose 4,2 mg/kg - antiartrítica em camundongos - foi possível calcular a dose de 20 mg para seres humanos. Essa concentração do extrato liofilizado de *B. trimera*, apresentou uma redução de 75% dos sintomas de artrite

reumatoide, em modelo experimental de artrite induzida por colágeno *in vivo* (COELHO, 2004).

A concentração de 200 mg do sulfato de HCQ, definida para formulação, é a dose usual de manutenção utilizada no tratamento da artrite reumatoide. A dose diária de hidroxiquina de 200 mg foi relatada como sendo tão eficaz quanto a dose de 400 mg, em um estudo controlado, duplo-cego, de longo prazo em pacientes tratados para artrite reumatoide (PAVELKA et al, 1989). Embora os dois grupos apresentassem redução significativa da atividade da doença, quando se comparou os efeitos colaterais na pele, gastrointestinais, e oculares, aqueles que receberam 200 mg ao dia desenvolveram um – terço do número de efeitos colaterais comparado aos grupos que receberam 400 mg diários.

Foram manipulados dois Lotes de Bancada (LBI e LBII) de 30 cápsulas planejadas para peso médio de conteúdo de 322 mg, variando-se apenas o tipo de diluente (tabela 6). Para uniformizar o tamanho de partícula foi utilizado tamis com abertura de malha 590 µm.

Para obtenção do LBI, inicialmente foi obtida uma mistura entre o extrato seco de *B. trimera* e o dióxido de silício coloidal, por cinco minutos. Em seguida, misturou-se o sulfato de HCQ com a celulose microcristalina por cinco minutos, na sequência foram adicionados o estearato de magnésio e o talco. Por fim, as misturas prévias foram homogeneizadas. O produto foi encapsulado em invólucro “0” branco e verde (Capsugel®) e acondicionado em recipiente de polietileno hermeticamente fechado. Todo o procedimento foi repetido para a obtenção do lote de bancada II, variando apenas o amido parcialmente pregelatinizado como diluente.

A avaliação da reologia dos pós de cada um dos lotes de bancada foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita no item 4.1.11.

Os controles de qualidade físicos dos lotes de bancadas foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. utilizando os seguintes equipamentos: balança analítica (Bioprecisa®, FA2104N), desintegrador (Nova Ética®, 301-AC) e aparelho para determinação de umidade (Sartorius Moisture Analyzer®).

Tabela 6 - Porcentagem dos componetes utilizados na formulação de cápsulas de extrato seco de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e sulfato de hidroxiclороquina.

Componentes	LBI	LBII
Extrato seco de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	6	6
Sulfato de hidroxiclороquina	62	62
Celulose microcristalina 200	28	-
Amido parcialmente pré-gelatinizado	-	28
Dióxido de silício coloidal	3	3
Estearato de Magnésio	0,7	0,7
Talco	0,3	0,3

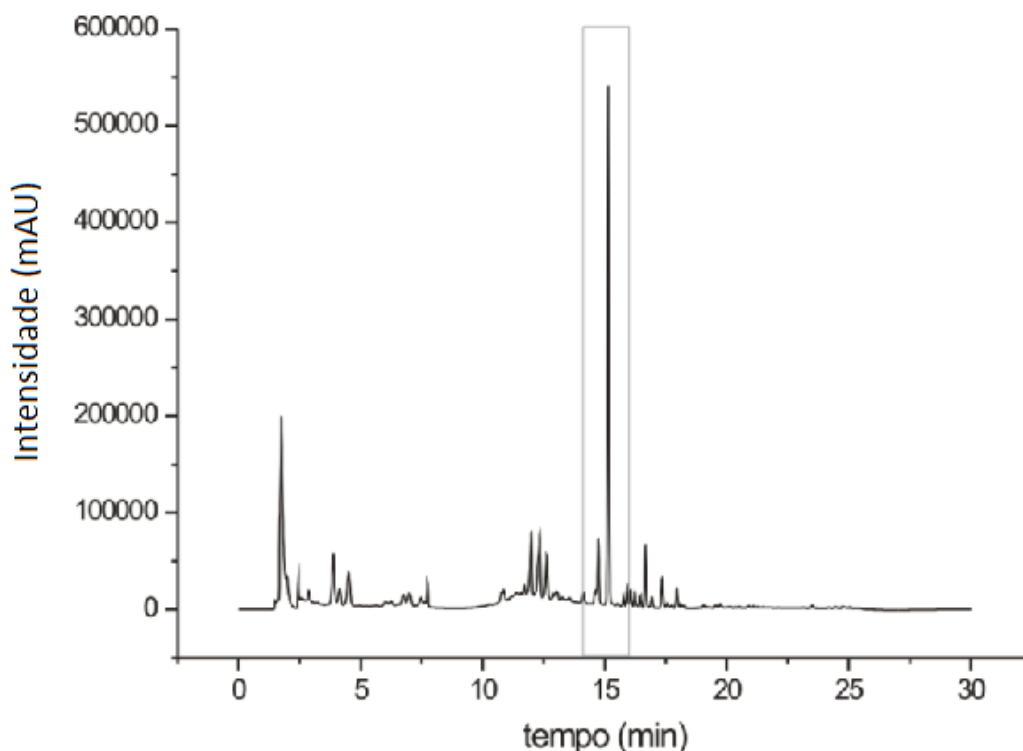
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da droga vegetal e padronização do extrato aquoso e seco por liofilização de *Baccharis trimera* (LESS.) DC.

5.1.1. Resultados obtidos a partir de análises da droga vegetal

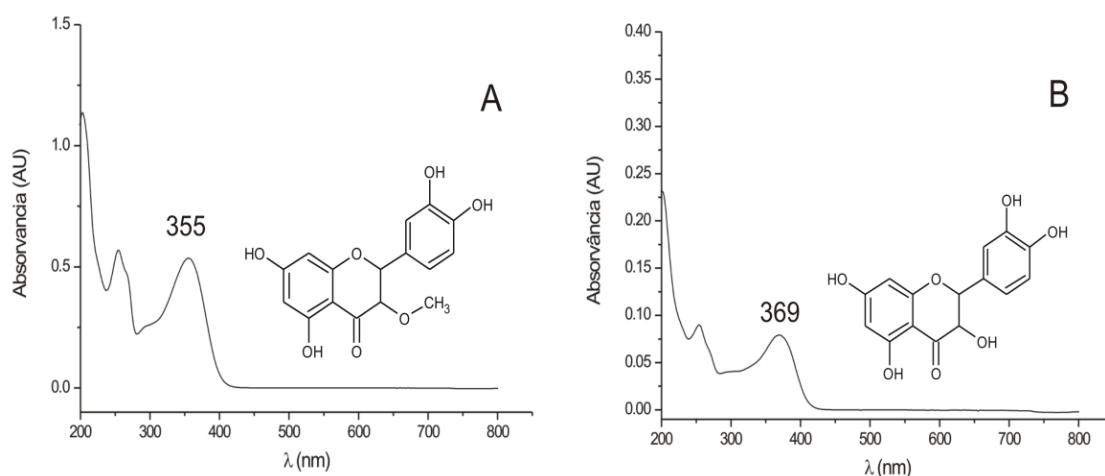
A partir da análise realizada no ensaio de identificação, obteve-se o cromatograma abaixo (figura 5). Neste é possível visualizar os picos referentes à quercetina e 3-O-metil-quercetina, nos tempos de retenção (T_R) de 14,7 e 15,1 min, respectivamente.

Figura 5 - Cromatograma de identificação de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. com os picos referentes a quercetina e 3-O-metil-quercetina, nos tempos de retenção (T_R) de 14,7 e 15,1 min, respectivamente.



Os espectros de varredura obtidos por detector DAD dos marcadores indicaram que a quercetina absorve em 369 nm, enquanto que a 3-O-metil-quercetina tem absorção característica em 355 nm, (figura 6). Esse resultado corresponde aos dados relatados na literatura (BRASIL, 2010; BORGIO et al., 2010).

Figura 6 - Espectros de absorção da 3-O-metil-quercetina (A) e quercetina (B) no extrato aquoso de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

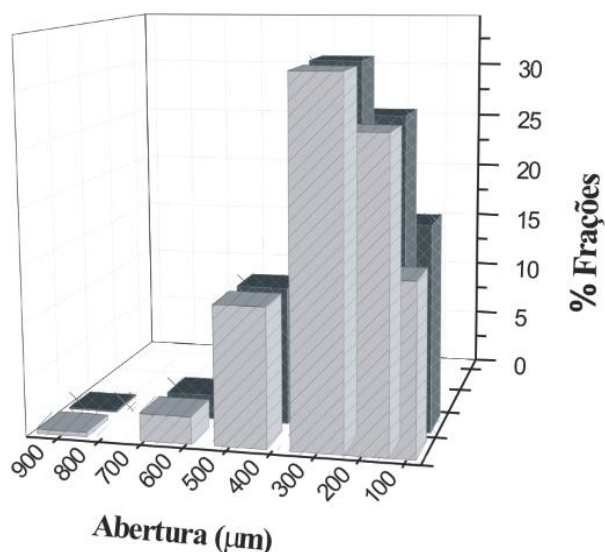


Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica revelaram a presença de flavonóides, saponinas, triterpenos, mono, di e sesquiterpenos e derivados cinâmicos, a partir da presença de bandas correspondentes aos padrões analíticos. Sendo negativo para cumarinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, taninos gálicos, alcalóides. Nenhuma amostra analisada mostrou a presença de alcaloide, resultado também obtido por outros autores anteriormente (MENDES; CARLINI, 2007; TASCHETTO, 2010).

O teste de afrogeniciade foi positivo, onde ocorreu abundância, persistência e altura da espuma compatível com o método utilizado, indicando a presença de saponinas (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

O resultado do tamanho de partícula analisado através do histograma de distribuição granulométrica do pó de *B. trimera* (figura 7) demonstra que as partículas do material vegetal encontraram-se predominantemente retidas no intervalo entre 250 e 350 μm 55% de todo material.

Figura 7 - Histograma de distribuição granulométrica da droga vegetal *Baccharis trimera* (LESS.) DC..



O tamanho médio das partículas determinado a partir do ponto de interseção das curvas de retenção e passagem foi de $239,5\mu\text{m} \pm 9,7$ (CV% 4,0). Seguindo critérios farmacopeicos, os resultados do ensaio de determinação granulométrica classificou o pó como semifino. Esta determinação é de extrema relevância, visto que o estado de divisão da droga vegetal é um dos principais fatores que interferem na eficiência do processo de extração.

Os resultados dos testes de determinação de perda por dessecação e teor de cinzas totais estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 - Perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

Ensaio	% $\pm$ DP*
Perda por dessecação	8,5 $\pm$ 1,23
Teor de cinzas totais	5,5 $\pm$ 0,67

DP*: desvio padrão

A perda por dessecação da droga vegetal, indicativo do teor de material volátil do vegetal e, indiretamente da umidade residual, o qual se encontra dentro do limite estabelecido pela farmacopeia que é 12% (tabela 7), indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal. Esta determinação é importante para o controle de qualidade microbiológico, pois um excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento

de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise de seus constituintes (SHARAPIN, 2000).

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie com as substâncias aderentes de origem terrosa (BRAGA et al., 2007; SIMÕES et al., 2007). O resultado da determinação de cinzas totais também apresenta-se dentro do limite estabelecido na monografia de *B. trimera* descrita na Farmacopeia Brasileira que é de 8% (tabela 7), indicando que a mesma não possui excesso de terra e/ou areia.

A curva de calibração obtida para o ácido clorogênico está representada na figura 8 e o perfil cromatográfico da droga vegetal está representado na figura 9. A concentração de ácidos cafêicos foi de 0,9% na droga vegetal. Com base nos tempos de retenção relativos descritos para o método na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), foi possível confirmar os tempos no cromatograma obtido, sendo eles: ácido clorogênico = 1 (Tr = 20,7 min), 3,4-dicafeoilquínico = 1,45 (Tr = 31,5 min); 3,5-dicafeoilquínico = 1,51 (Tr = 32,8 min) e 4,5-dicafeoilquínico = 1,54 (Tr = 33,6 min).

Figura 8 - Curva de calibração utilizada para cálculo dos teores de ácidos cafêicos.

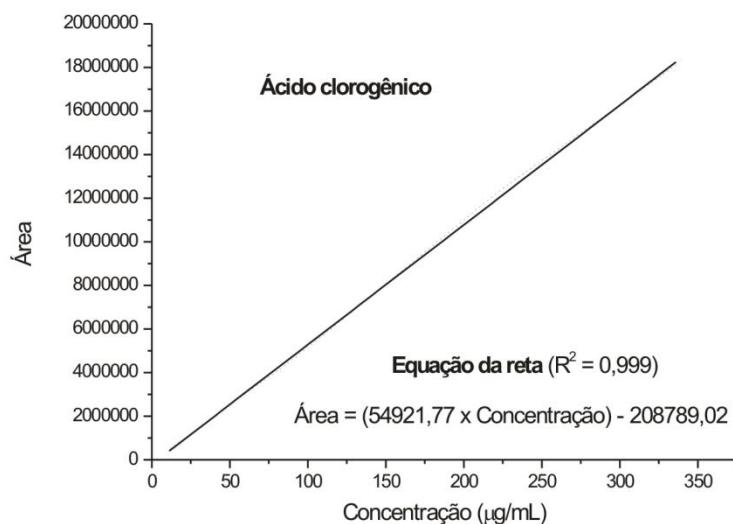
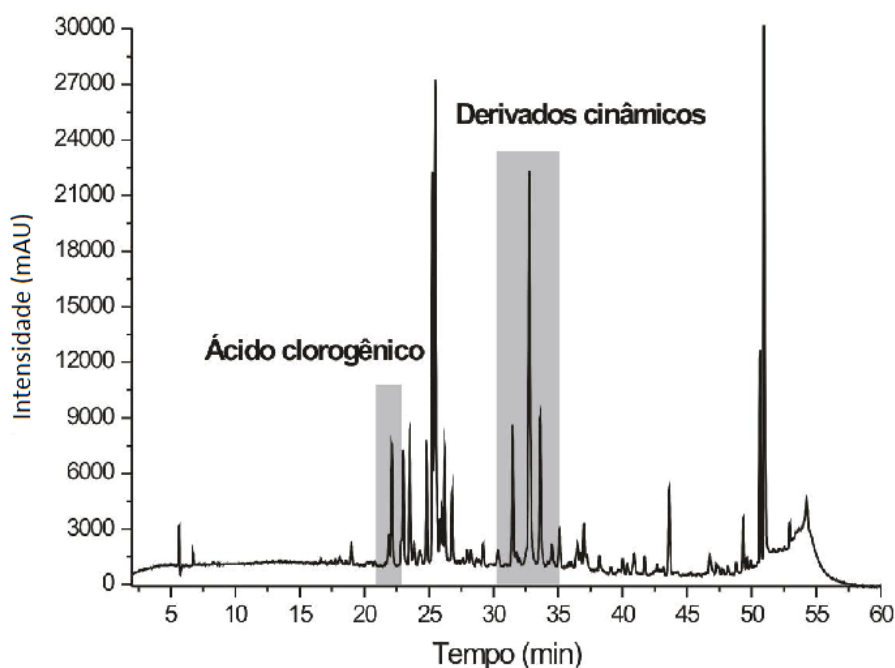


Figura 9 - Perfil cromatográfico para ácidos caféicos da droga vegetal de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..



Vários trabalhos citam a importância farmacológica desses ácidos caféicos, incluindo atividade anti-oxidante (CHUDA et al., 1996), hepatoprotetora (BASNET et al., 1996), antibacteriana (SHOLZ; HEINRICH; HUNKLER, 1994), anti-inflamatórios (GONGORA, 2002), e antiviral (MATSINGOU et al., 2000) atribuída a esses derivados do ácido quínico, justificando a utilização destes como marcadores da espécie.

5.1.2. Obtenção e controle do extrato aquoso

A obtenção do extrato aquoso por infusão possibilitou a posterior obtenção do extrato seco a ser utilizado como matéria prima para obtenção de formas farmacêuticas sólidas. Nesse sentido o controle desta etapa se faz de extrema relevância. A extração permitiu a obtenção de 3 L de extrato aquoso com pH de 5,38 e densidade de 1,06 g.mL⁻¹.

5.1.3. Obtenção do extrato seco liofilizado

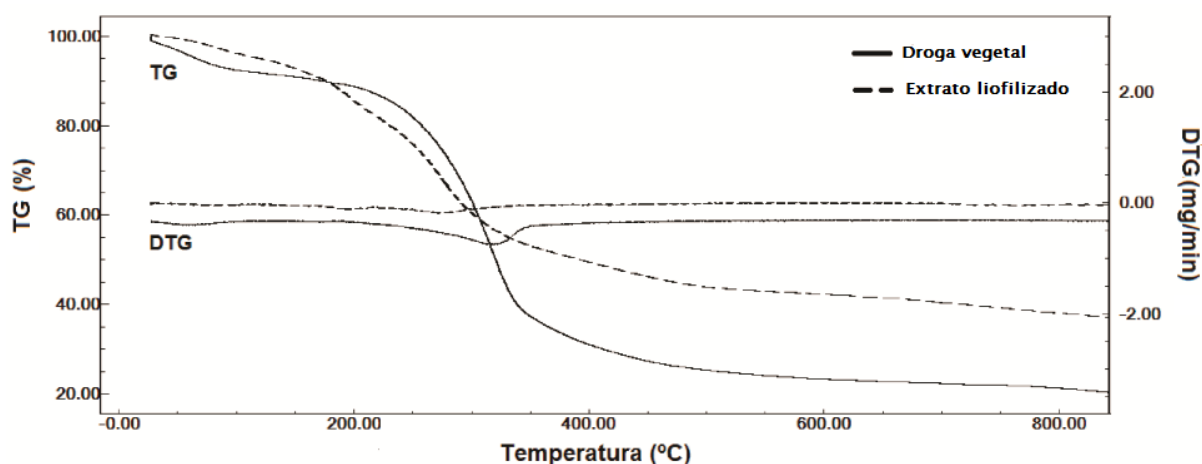
A partir do processo de secagem por liofilização do extrato aquoso, obtido possível obter extrato seco com um rendimento de 9% (p/p). Rendimento semelhante foi encontrado no trabalho de Coelho et al. (2004), que utilizou o mesmo procedimento para obtenção do

extrato liofilizado que, posteriormente, foi testado em relação a atividade antiartrítica da espécie.

5.1.4. Caracterização térmica da droga vegetal e extrato seco liofilizado

A curva de TG da droga vegetal de *B. trimera* apresenta um primeiro evento de perda de água na faixa de 27-100°C ($\Delta m = 7,6\%$). A decomposição térmica se inicia por volta de 230°C com o percentual de perda de massa total de 64% até a temperatura final de 800°C. A análise térmica do extrato liofilizado de *B. trimera* demonstrou um perfil térmico diferenciado. Inicialmente não foi observado o evento de perda de água até 100°C, mostrando a eficiência do processo de secagem. A decomposição térmica apresentou dois eventos degradativos, o primeiro entre 160 e 181°C e o segundo na faixa de 251 e 312°C, evidenciadas pelos declives da curva de TG. O primeiro evento de degradação mostrou-se antecipado se comparado ao início da degradação da droga vegetal (figura 10).

Figura 10 - Curvas de TG e DTG da droga vegetal e extrato seco por liofilização de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..



Este resultado é de extrema importância para o planejamento do processo produtivo de formas farmacêuticas sólidas a partir desse extrato, pois evidencia a necessidade do controle de temperatura durante o processo de armazenamento e produção.

5.1.5. Resultados obtidos a partir de análises do extrato seco liofilizado

No doseamento de ácidos caféicos do extrato seco todos os compostos mostraram linearidade adequada para a quantificação. As equações lineares e os valores de R^2 obtidos

estão demonstrados na tabela 8. A repetibilidade, baseada em seis amostras de cada resíduo, foi analisada por CLAE e o desvio-padrão relativo dos conteúdos de cada constituinte variou entre 3,11 e 3,73%. O conjunto de valores das variações entre-dias e inter-dias dos quatro mais importantes analitos do extrato liofilizado de *B. trimera* foram tratados por ANOVA *one-way* e os resultados expressos na tabela 9. Os resultados obtidos para o parâmetro robustez para diferentes tipos de agitação foram estatisticamente analisados por ANOVA *one-way* para avaliar a diferença entre as médias. Todos os dados foram analisados separadamente e assim, os valores de *Fcal* (com 0,95 de intervalo de confiança) demonstraram-se menores que os valores de *Ftab* o que consiste em dizer que qualquer tipo de agitação pode ser utilizada para a obtenção da solução extrativa.

Tabela 8 - Equações de regressão, determinação dos limites de detecção e quantificação por CLAE dos ácidos caféicos presentes do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

Composto	Equação linear	R ²	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
Ácido 5-cafeoilquínico	$f(x) = 223028,88 x - 44767,86$	0,996	0,30	1,00
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	$f(x) = 265491,29 x - 5612,43$	0,998	0,61	2,05
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	$f(x) = 612543,77 x - 24339,46$	0,994	0,65	2,19
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	$f(x) = 243624,90 x - 18684,20$	0,992	0,63	2,10

Tabela 9 - Resultados de precisão para o método de quantificação de ácidos caféicos presentes no extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

Composto	Precisão Entre-dias		Precisão Inter-dias	
	F cal	F tab	F cal	F tab
Ácido 5-cafeoilquínico	0,183502	18,51282	1,171079	18,51282
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	0,183502	18,51282	1,171079	18,51282
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	0,399359	18,51282	5,989541	18,51282
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	3,960243	18,51282	0,403206	18,51282

A padronização obtida para esse extrato é 0,2 mg de ácidos cafeicos em 1g do extrato de extrato seco.

Na determinação das propriedades reológicas, o extrato seco por liofilização de *B. trimera* apresentou-se como um pó de bom escoamento quando relacionado apenas o ângulo de repouso. Considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30°. Ângulos superiores a 40° sugerem difícil fluxo (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). O tempo de escoamento do pó apresentou-se como

infinito, já que o extrato é bem aerado, com grande área superficial, o que resulta em grande variação entre a densidade aparente e compactada do extrato seco.

Wells (2005) classifica os pós de acordo com o índice de Carr como: fluxo excelente (5-15%); fluxo bom (12-16%); favorável a intolerável (18-21%); fluxo fraco (23-35%); muito fraco (33-38%) e fluxo extremamente fraco (maior que 40%). Ainda segundo esse autor, pós com fator de Hausner menor que 1,25 indicam bom fluxo e acima desse valor, mau fluxo. Os índices de Carr e fator de Hausner obtidos no teste demonstram que o pó de *B. trimera* necessita de excipientes como diluentes e lubrificantes que incrementem suas propriedades de fluxo para obtenção de forma farmacêutica sólida, visto suas características de fluxo muito fraco, inerentes a um extrato vegetal seco obtido por liofilização (tabela 10).

Tabela 10 - Propriedades reológicas do extrato seco de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..

Propriedades	Média
Densidade aparente	0,24 g.mL ⁻¹
Densidade compactada	0,38 g.mL ⁻¹
Fator de Hausner	1,60
Índice de Carr	37,36
Ângulo de repouso	27,81°
Tempo de escoamento	Infinito

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).

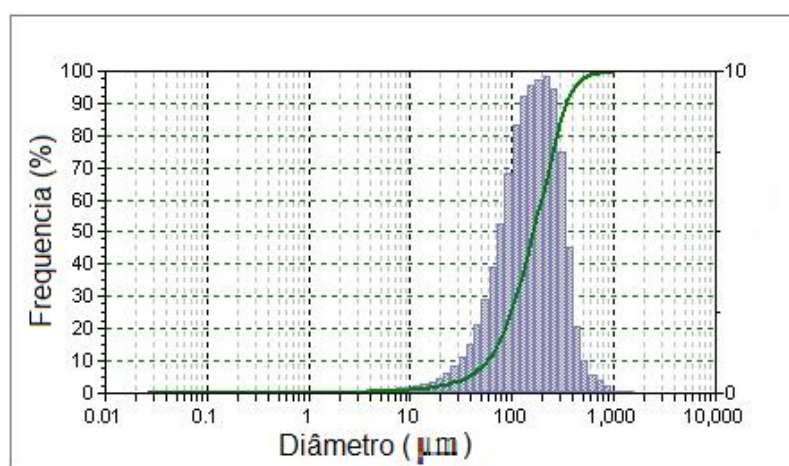
Durante a determinação da área superficial e porosidade do extrato seco, a amostra analisada seguiu a isoterma de BET apresentando linearidade segundo o modelo proposto para cálculo da área superficial. A faixa de aplicação da isoterma de BET é válida para a determinação de microporos e mesoporos (NERY et al., 2008), aplicando-se a amostra analisada.

Os resultados obtidos afirmam que o produto analisado possui mesoporos, pois a área superficial definida foi de 61,82 m².g⁻¹, com volume e tamanho de poro de 0,055 cm³.g⁻¹ e 35,48 Å, respectivamente.

Considerando o parâmetro molhabilidade das partículas, em virtude do tamanho dos poros e da elevada área superficial, defini-se que o extrato seco obtido possui características adequadas para ser utilizado como insumo vegetal na obtenção de formas farmacêuticas sólidas.

A granulometria de pós, aliada à outras propriedades físicas, permite inferir sobre a influência destas características nos processos de desenvolvimento de um produto farmacêutico. Os dados da análise de distribuição granulométrica mostraram que a amostra apresentou diâmetro médio das partículas de 188,6 μm , que poderia ser classificado como um pó fino se a metodologia utilizada fosse farmacopeica (figura 11).

Figura 11- Distribuição do tamanho de partículas do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..



Logo, neste caso, prevê-se que as partículas terão maior propensão à adsorção de umidade e, por conseguinte, podem levar à formação de aglomerados de partículas (BELLAMY et al., 2008).

Segundo o estudo de solubilidade do extrato seco frente ao metanol e etanol, o insumo vegetal mostrou-se muito pouco solúvel e/ou praticamente insolúvel, devido ao tipo de solvente utilizado para desenvolvimento do extrato aquoso.

As análises de solubilidade são válidas para a temperatura de 25 °C, podendo justificar o termo pouco solúvel para a água. A utilização de um tensoativo, lauril sulfato de sódio, favoreceu ao extrato seco um incremento de solubilidade, devido ao aumento da molhabilidade gerada pela quebra da tensão superficial da água.

O extrato seco mostrou ser mais solúvel em NaOH 0,1M do que nos outros solventes testados. Podendo ser justificado pela predominância de substâncias de caráter

ácido, como por exemplo, os polifenóis, pois o mesmo não foi observado com a solução aquosa de HCl 0,1M. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Solubilidade do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. em diferentes solventes.

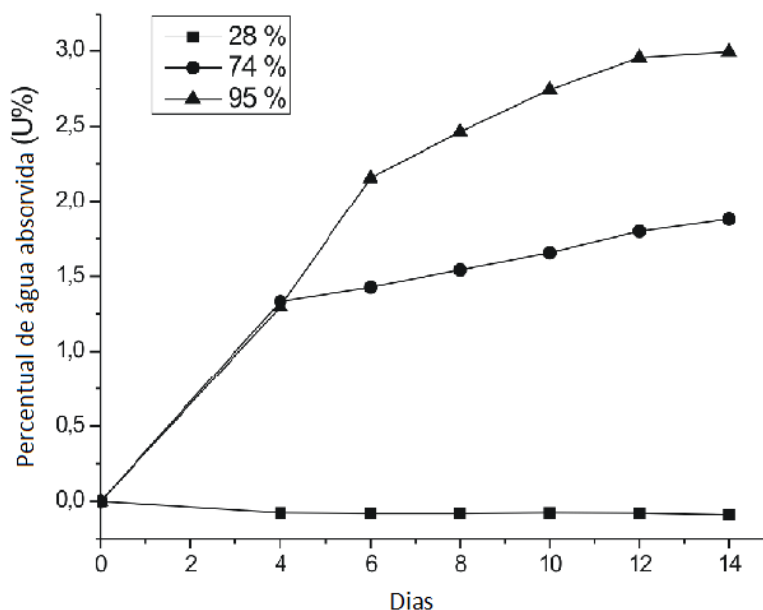
Solvente	Volume gasto	Termo descrito
Água	2,0 mL	Pouco solúvel
NaOH 0,1M	0,5 mL	Ligeiramente solúvel +++
Lauril sulfato de sódio 1%	1,0 mL	Ligeiramente solúvel +
HCl 0,1M	> 100 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Metanol	75 mL	Muito pouco solúvel
Etanol	75 mL	Muito pouco solúvel

+ = ligeiramente solúvel, +++ = ligeiramente à solúvel (Brasil, 2010)

A umidade é um fator que influencia a estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos pulverulentos, além de poder afetar as características reológicas do produto que são essências no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida (CHAVES; COSTA; FREITAS, 2009).

As propriedades higroscópicas do extrato liofilizado da *Baccharis trimera* L. foram determinadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade. As curvas de sorção de umidade em função do tempo obtidas para UR de 28, 74 e 95% estão representadas na figura 12.

Figura 12 - As curvas de sorção de umidade do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC..



Verificou-se que a absorção de umidade pelas amostras testadas variou em função do teor de umidade do ambiente e do tempo de exposição do extrato à determinada umidade, observando um aumento da umidade absorvida à medida que se aumentou as condições supracitadas. Houve, ao fim de 14 dias, um aumento de aproximadamente 1,8 e 3,0% do peso das amostras nas condições de 74 e 95% de UR, respectivamente, proveniente de absorção de água. Os resultados garantem uma adequada segurança quanto à estabilidade físico-química do extrato seco frente à umidade, já que, mesmo em condições extremistas de UR, o ganho de peso devido absorção de água não é tão significativo e inferior aos 12% estabelecido como limite máximo de umidade (BRASIL, 2010).

Quanto à condição de 28% de UR, por se tratar de sílica, há uma redução do peso das amostras, explicada pela capacidade de sorção de água pela sílica. Aproximadamente 0,09% de água foi absorvida pela sílica ao fim do experimento. Tal resultado corrobora o hábito de se estocar o extrato seco em dessecador contendo sílica uma vez que, ao fim de 14 dias, a perda de água pelo extrato seco ainda não havia alcançado um patamar constante. Assim, a estocagem e armazenagem do pó seco nessas condições são, então, recomendadas.

Vale salientar que os valores de higroscopicidade obtidos não devem ser considerados absolutos, visto que as amostras foram expostas a condições extremas de UR e não estavam acondicionadas em embalagem primária.

5.2. Caracterização físico-química do fármaco antirreumático sulfato de hidroxicloroquina.

5.2.1. Caracterização em 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 aminas 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 $950 - 1150\text{ cm}^{-1}$). A tabela 12 mostra as principais bandas relacionadas aos respectivos tipos de vibração da ligação, região

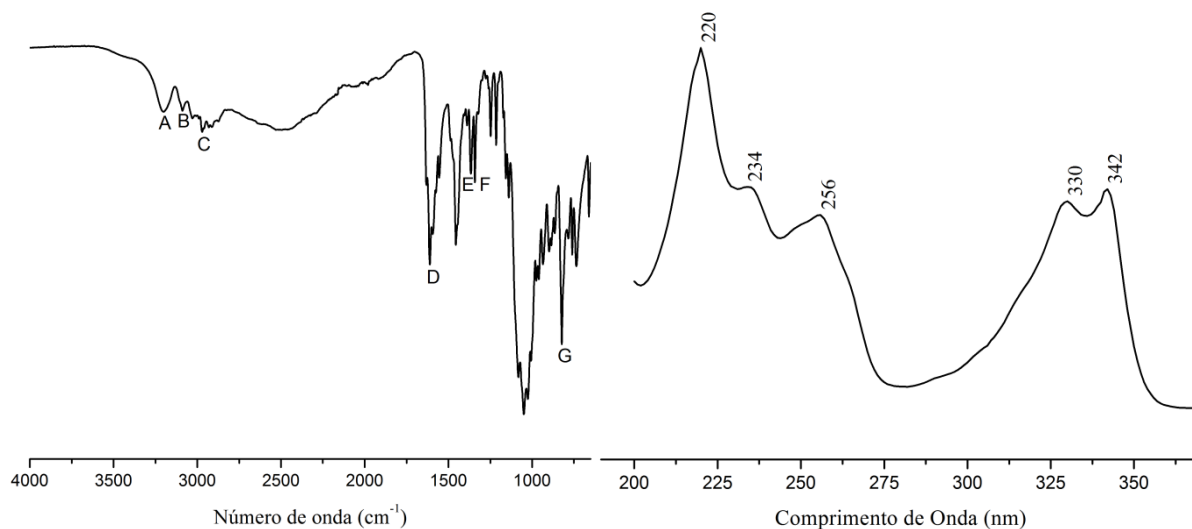
esperada e grupos funcionais. A enumeração correlaciona os valores das bandas e suas respectivas posições no espectro.

Tabela 12 - 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).

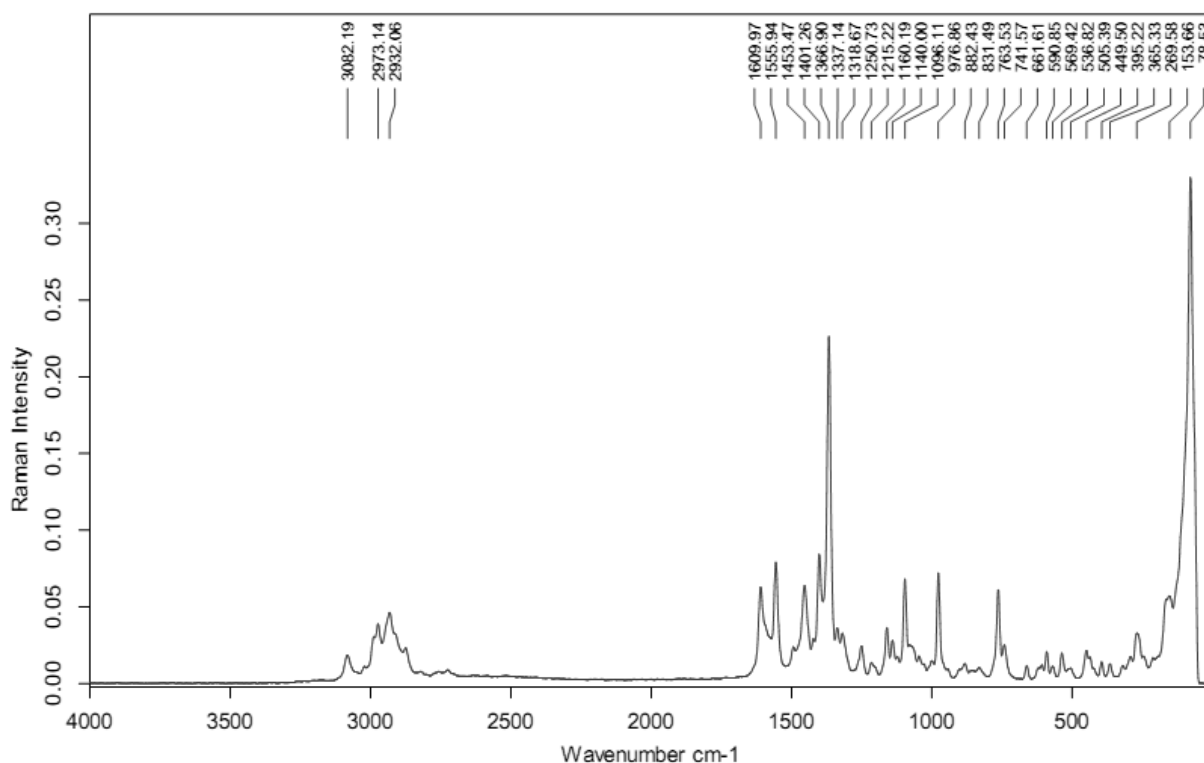
Figura 13 - (a) Espectro de absorção na região do infravermelho e (b) Espectro de absorção na região do ultravioleta do sulfato de hidroxicloroquina.



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} .

Figura 14 - Espectro de Raman do sulfato de hidroxiclороquina.



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

Tabela 13 - Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H para o sulfato de hidroxiclорокина 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	Tripleteo
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 14) evidencia a ionização positiva da base livre por ser composta por três grupamentos amina facilmente protonados, evidenciando um sinal com 100% de intensidade característico $[\text{M} + 1]^+ = 336,18 \text{ m/z}$, 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 uma fragmentação do íon parente na fonte, podendo ser observado o perfil de fragmentação pelos sinais em $318,17 \text{ m/z} = [\text{M} - 16]^+$, $302,22 \text{ m/z} = [\text{M} - 32]^+$, $292,16 \text{ m/z} = [\text{M} - 42]^+$, $247,10 \text{ m/z} = [\text{M} - 87]^+$ 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 14).

.Figura 15 - Espectro de massa da HCQ e estrutura química da hidroxicloroquina base livre.

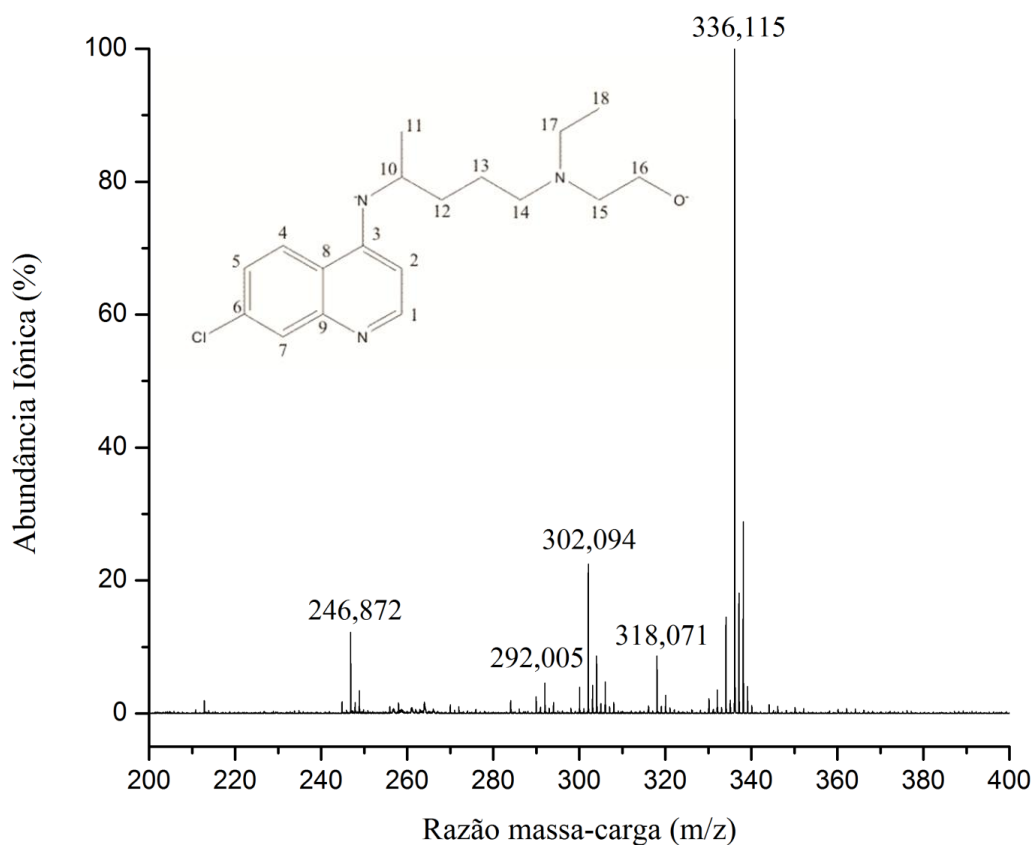
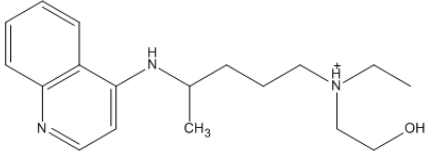
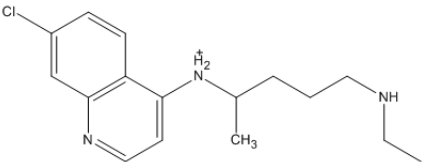
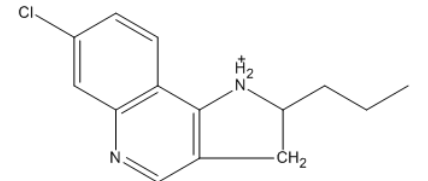
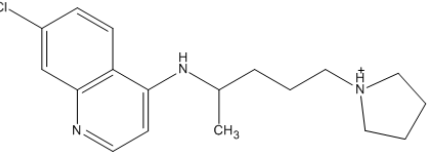


Tabela 14 - Fragmentos da hidroxicloroquina base livre obtidos através de ionização do pico majoritário.

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 semiquantitativo 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 15.

Tabela 15 - Solubilidade do sulfato de hidroxycloquina 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.

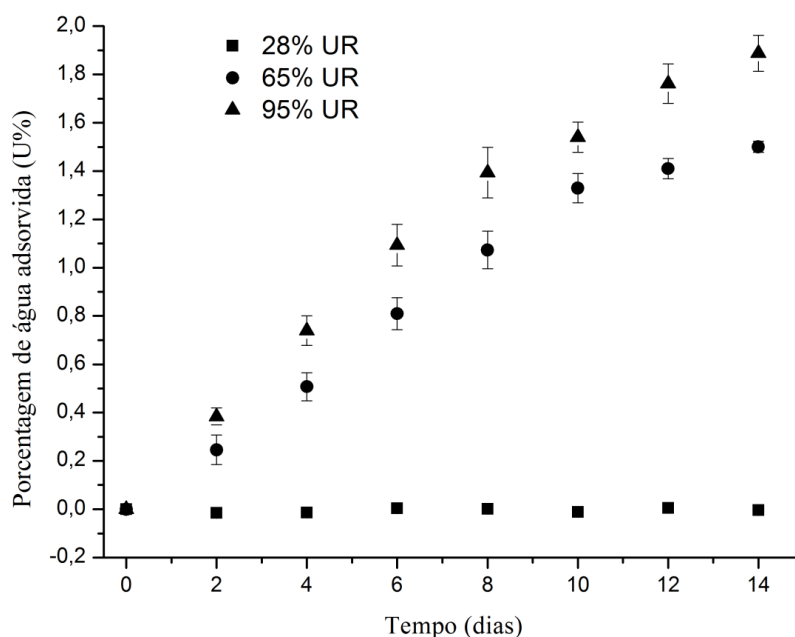
5.2.2. Caracterização em nível de partículas

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 sulfato de hidroxicloroquina em diferentes condições de umidade.



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 95%), 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.

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

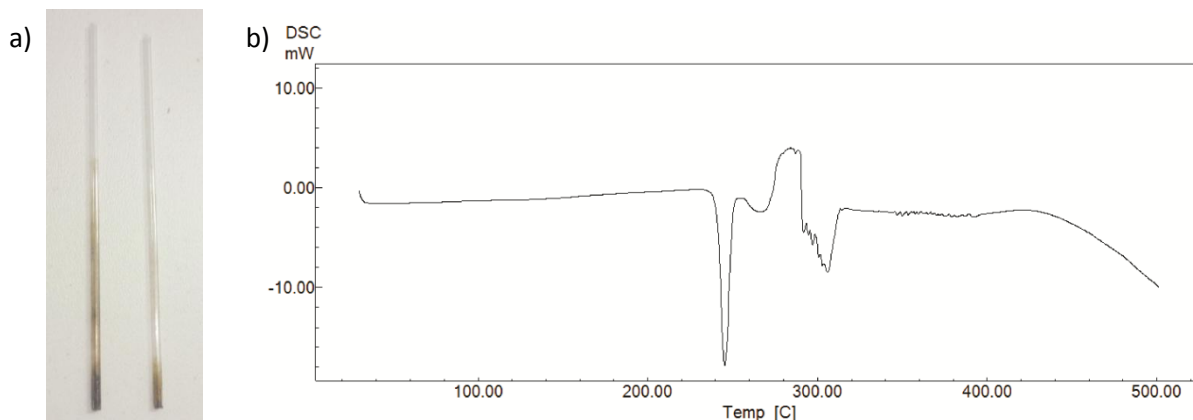
adquiridas demonstraram-se consonantes, sendo o grau de pureza calculado pelo DSC, de maior confiabilidade.

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 $98,85 \pm 0,6\%$ 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 hidroxiclороquina (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 (Figura 21). 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: $17,18^\circ$ e $17,24^\circ$, 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 hidroxicloroquina.

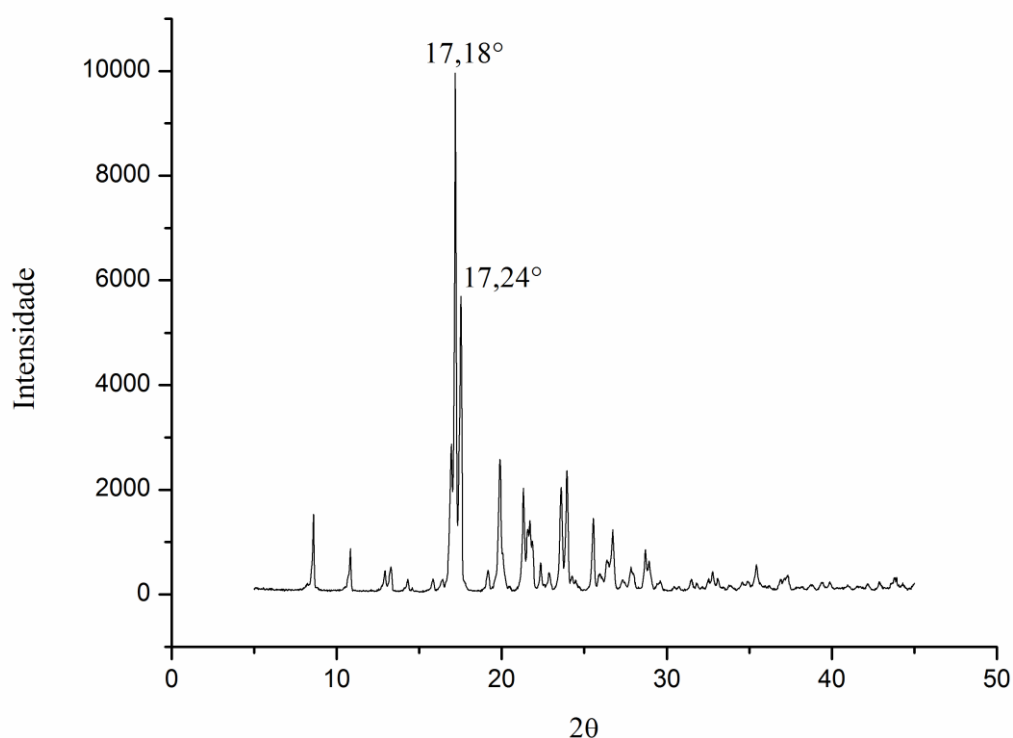
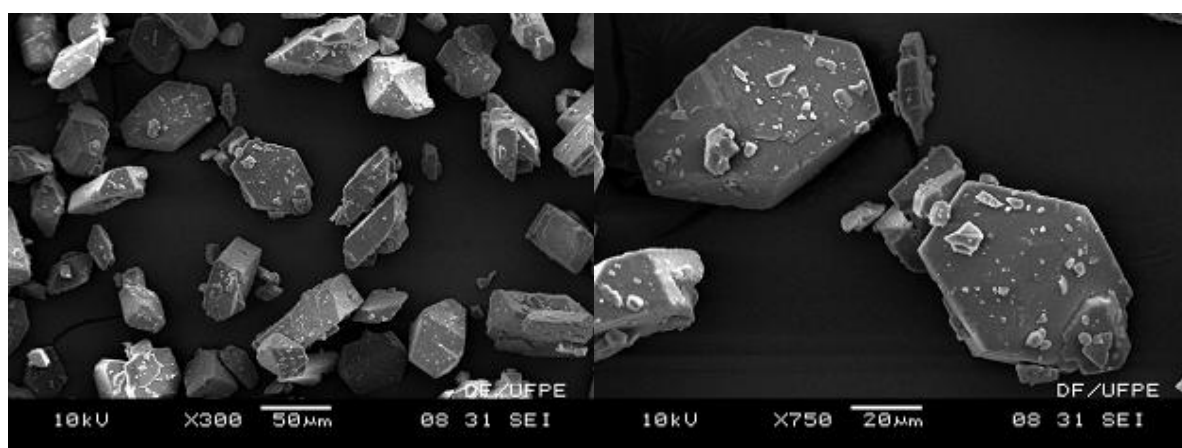


Figura 19 - Micrografias de varredura do sulfato de hidroxicloroquina com aumentos de 300 e 750 vezes.



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

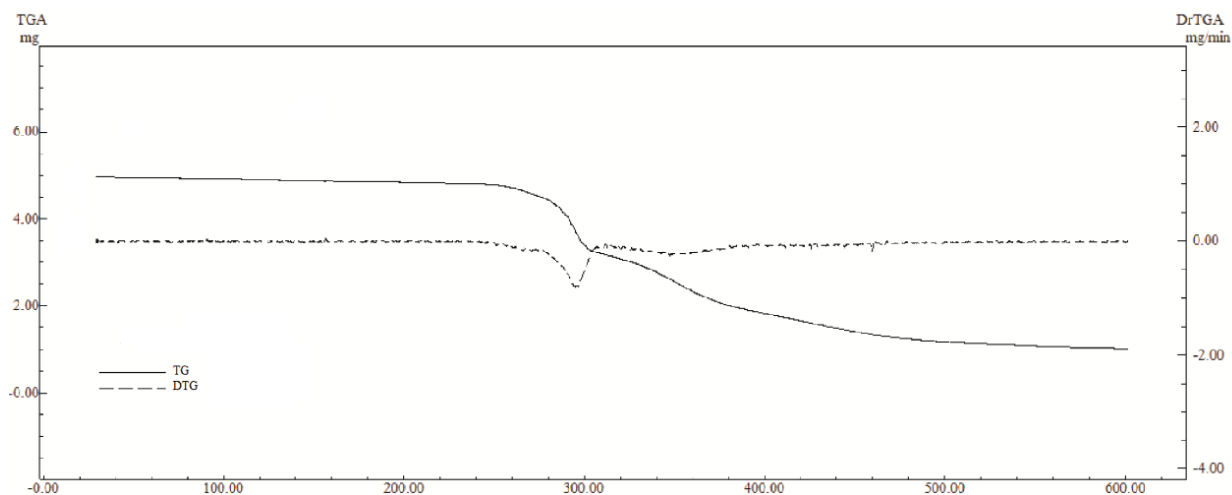
processos de síntese ou do processamento farmacêutico, o que pode vir a formar outras polimórficas do fármaco (RIBEIRO et al., 2003).

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-SOBRINHO 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.

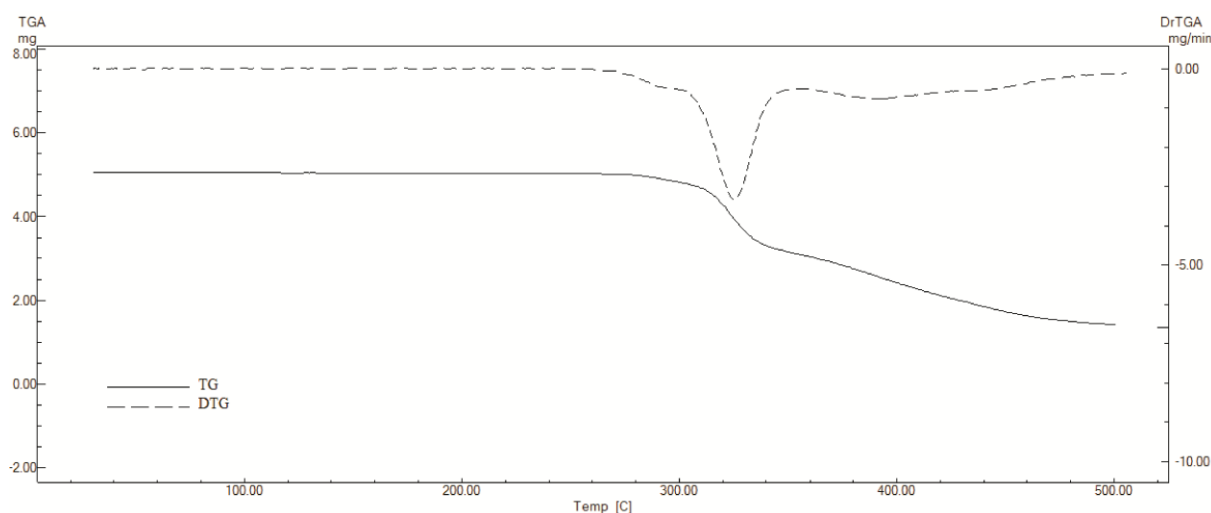
A curva TG do sulfato de HCQ está apresentada na figura 20. Foram observados três eventos de perda de massa ao longo da análise. O primeiro, concomitante ao final do evento relativo à fusão do fármaco, com início em 254,78°C e término em 278,01°C resulta em uma perda de massa de 5,56% da massa inicial (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 hidroxyclorequina.



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 pode ser visualizada 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°C) da massa inicial.

Figura 21 - Curva TG/DTG do sulfato de hidroxyclorequina ($\beta = 40$ °/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 & LOBEMBERG, 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 semiquantitativo 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 16.

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 3 (Onde: ASC é a área sob a curva do tempo que se deseja avaliar e ATG, a área total do gráfico).

$$\text{Equação 3. } ED = \frac{(ASC_t)}{ATG} \times 100$$

Tabela 16 - Solubilidade do sulfato de hidroxiclороquina em diferentes solventes.

Solvente	Concentração (µg.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 17.

Tabela 17 - Porcentagem de sulfato de hidroxycloquina 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, observou-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 18). Foi observado 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 18 - Eficiência de dissolução para o sulfato de hidroxiclороquina nos tempos 5 e 30 minutos, em diferentes condições de pH.

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

5.2.3. Caracterização em nível de aglomerados de partículas

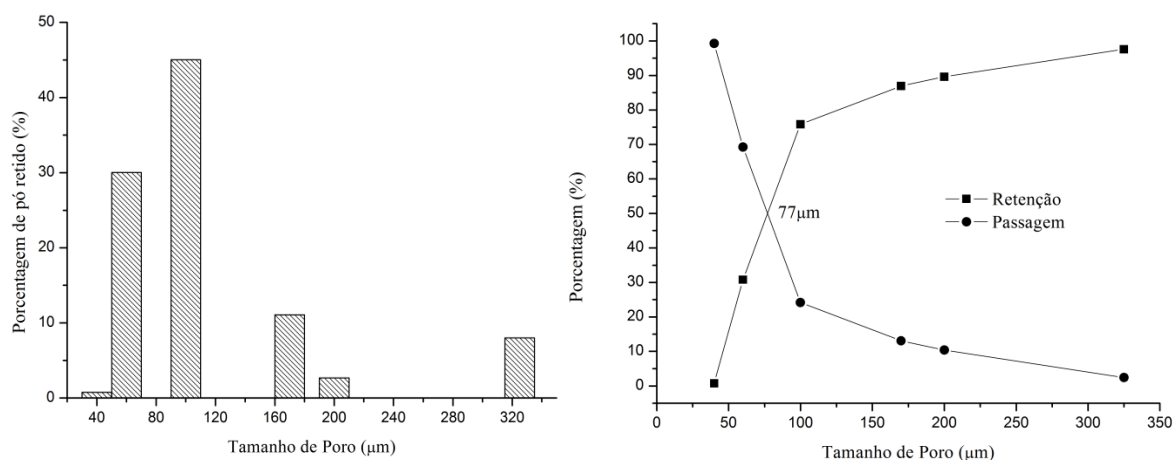
O entendimento sobre os pós permite qualificar e quantificar fatores que não podem ser negligenciados durante o desenvolvimento de formas farmacêuticas. Isso exerce influência na alimentação uniforme das máquinas e nas propriedades físicas e mecânicas dos comprimidos (MARSHALL, 2001).

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.

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.



Os resultados obtidos no estudo de reologia do sulfato de HCQ (Tabela 19) indicam que a matéria-prima tem bom fluxo e características de compactação, não necessitando da incorporação de adjuvantes deslizantes, como o aerosil® 0,2% (WELLS, 2005).

Tabela 19 - Propriedades reológicas do sulfato de hidroxyclorequina.

Propriedades	Média
Densidade aparente	0,77 g.mL ⁻¹
Densidade compactada	0,83 g.mL ⁻¹
Fator de Hausner	1,08
Índice de Carr	7,22
Ângulo de repouso	6,28°
Tempo de escoamento	< 1s

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).

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) (NERY et al., 2008; LIMA, 2000).

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 20 - 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

5.2.4. Caracterização em 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).

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).

5.2.5. Otimização de método analítico para doseamento do sulfato de hidroxiclороquina

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. 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) seja devido 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.

Portanto, o princípio determinante da otimização do método analítico para determinação de teor foi o fator de cauda do pico referente ao HCQ. Utilizando o fator de cauda como a variável dependente, foi realizado um planejamento fatorial 3^3 (Tabela 20) com os seguintes fatores: fluxo e composição da fase móvel em combinação com a temperatura da coluna cromatográfica, pelo modelo de *Box-Behnken*.

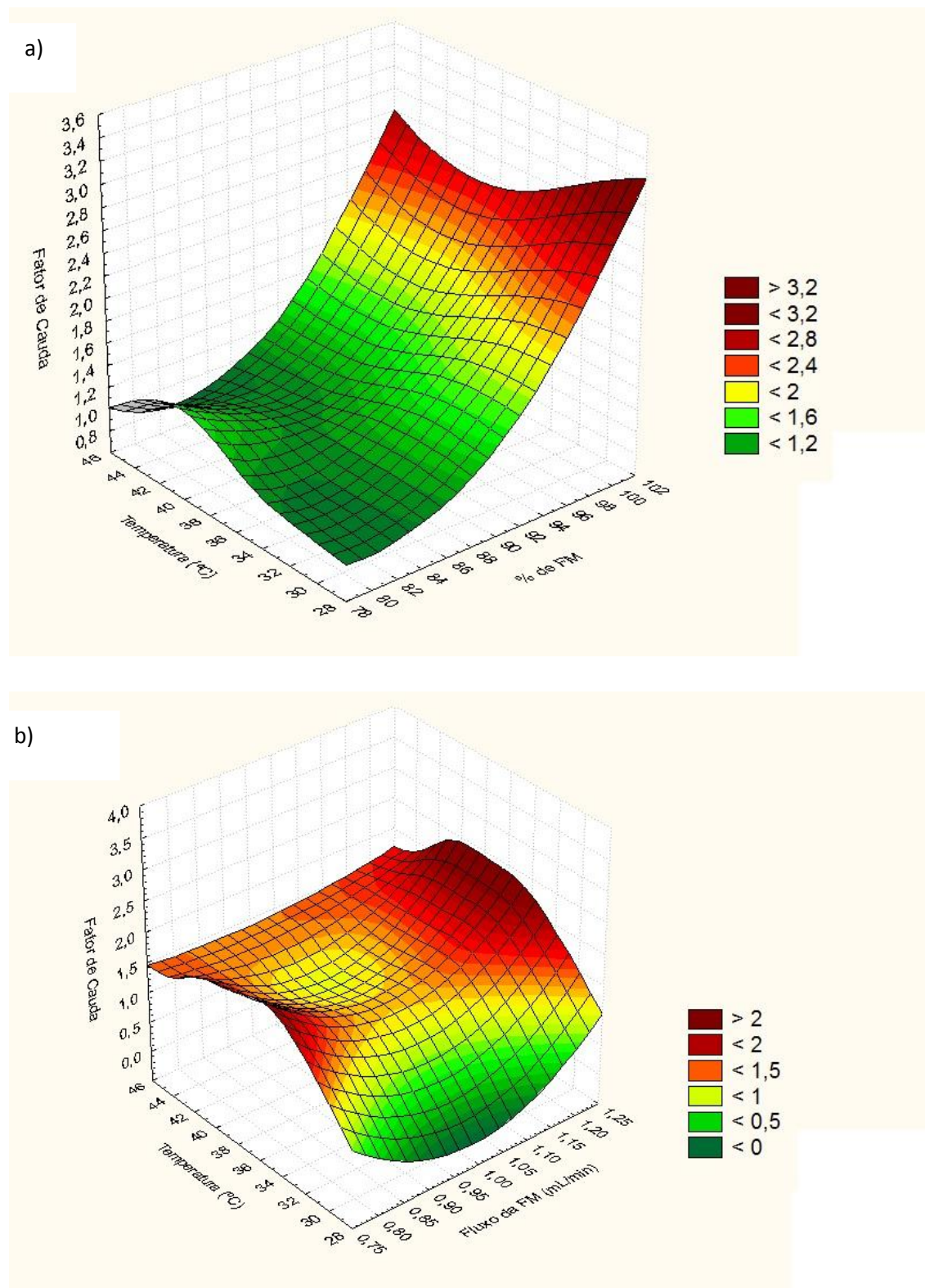
A partir da análise dos gráficos de superfície-resposta obtidos pelo software Statistica® é possível observar as condições em que a interação entre os fatores analisados geram picos-resposta do analito que possuem fator de cauda com valor numérico mais próximo de 1 (indicado pelas cores verdes claro e escuro). A resposta da qualidade está inserida 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).

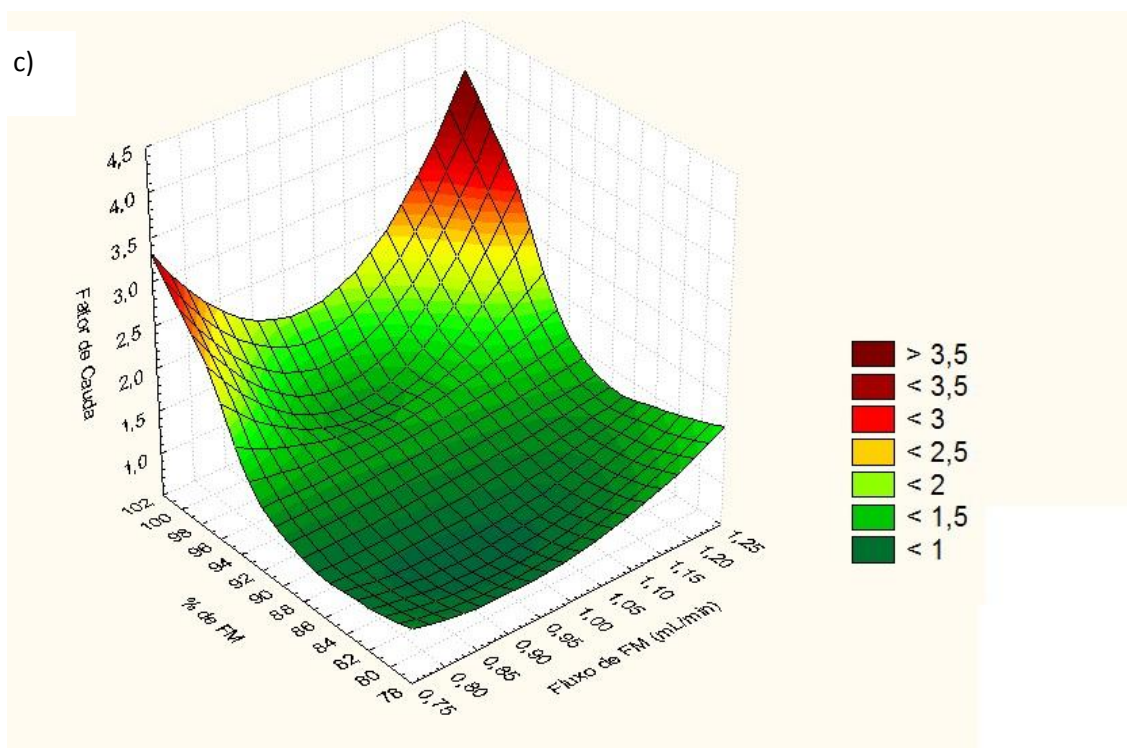
Esta ferramenta possibilitou a otimização do método analítico para determinação de teor, estabelecendo como condição analítica ideal (realce na tabela 21): a temperatura de 45°C, a um fluxo de FM de 0,8 mL/min, em uma proporção de 80:20 Fase Móvel:Metanol como fase eluente.

Tabela 21 - Matriz do planejamento fatorial 33 para otimização do método analítico de quantificação do sulfato de hidroxycloquina.

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
19	1,0	40	70:30
20	1,0	45	70:30
21	1,0	35	70:30
22	1,2	40	70:30
23	1,2	45	70:30
24	1,2	35	70:30
25	0,8	40	70:30
26	0,8	45	70:30
27	0,8	35	70:30

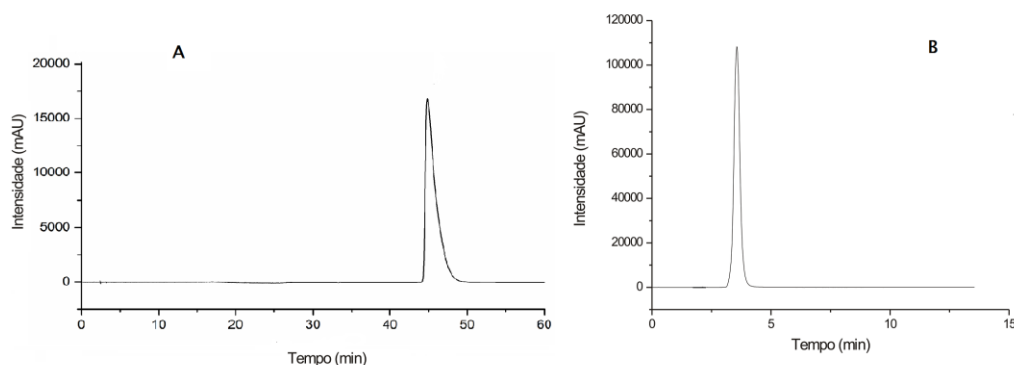
Figura 23 - Gráficos de superfície-resposta correlacionando o fator de cauda do pico resposta da HCQ ao fluxo e composição da fase móvel bem como a temperatura da coluna cromatográfica.





Os cromatogramas obtidos nas análises do sulfato de HCQ pelo método da USP (figura 24a) e o método otimizado nesse estudo (Figura 24b) evidenciam as melhorias em relação ao tempo de retenção do pico, que no método USP aparece entre 40 e 50 minutos, enquanto que no método otimizado é visualizado antes dos cinco minutos. O método de referência utiliza ainda uma taxa de fluxo elevada ($1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), que aumenta ainda mais o consumo de solventes dispendiosos, tais como acetonitrila de grau HPLC. No método otimizado esse fluxo cai para $0,8 \text{ mL/min}$. Mas o maior problema do método USP é o alto valor para fator de cauda do pico (2,8), que seria aceitável se a droga não fosse uma mistura racêmica, uma vez que a coeluição dos isômeros pode ocasionar uma integração de picos não confiáveis. O método de HPLC otimizado permitiu a quantificação de sulfato HCQ, apresentando um pico de alta definição, que fornece fator de cauda igual a 1,087. Isto promove a boa coeluição de isômeros do HCQ, assegurando uma quantificação precisa da matéria-prima enquanto mistura racêmica.

Figura 24 - Cromatogramas do doseamento do sulfato de hidroxiclороquina pelo método farmacopeico (A) e pelo método otimizado (B).

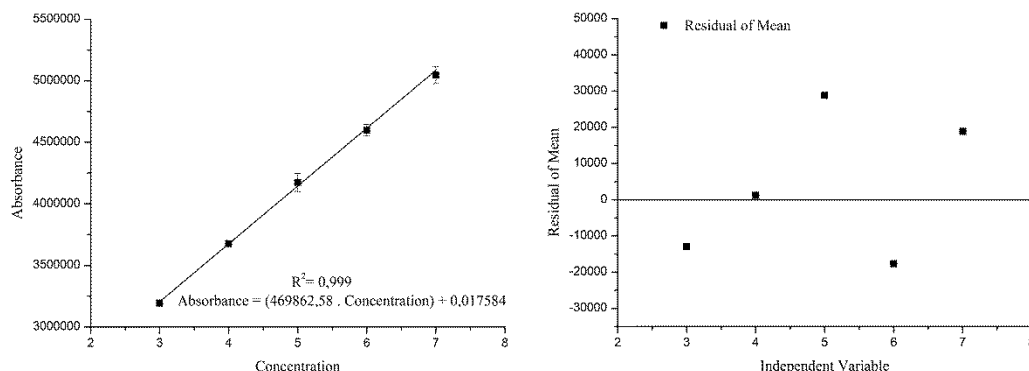


A eficiência do novo método de doseamento levou a necessidade de validação do ensaio.

Através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foi possível determinar o valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9995$). Este valor indica que 99,9% do total de variação em torno da média é explicado pela regressão, demonstrando que existe uma correlação linear entre as duas variáveis (absorvância e concentração), uma vez que os parâmetros estão dentro dos limites prescritos ($R^2 \geq 0,99$) (ICH) (Figura 25a).

O gráfico de dispersão mostrado na figura 24b demonstra que não houve falta de ajustes no método. Portanto, existe uma quantidade mínima de erros aleatórios, mostrando não existir qualquer erro sistemático na análise, que pode ser observada pela distribuição heteroscedástica dos pontos. Outra informação relevante é que, pelo menos, um ponto toca a linha. Isto significa que um dos valores obtidos na análise corresponde fielmente aos valores de referência.

Figura 25 - a) Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade e b) Respectivo gráfico de dispersão.



O LD e LQ foram calculados (0,04 e 0,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Estes valores indicam que o método é muito sensível em relação à detecção e quantificação da droga sem grande interferência do equipamento.

O método mostrou-se preciso em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 22). Em relação a repetibilidade, os resultados foram satisfatórios, entre $5,02 \pm 0,08$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com um coeficiente de variação de 1,56%, que foi inferior ao valor máximo recomendado pela ANVISA (<5%) [ANVISA]. Como para a precisão intermediária, evidenciou-se estatisticamente por ANOVA de duas vias que o método era preciso para análises realizadas por analistas diferentes no mesmo dia como seja em dias diferentes. Isto foi revelado devido ao facto de que os valores de F-calculados foram sempre inferiores a F-tabulados (crítica).

Tabela 22 - Análises do parâmetro precisão.

Repetibilidade							
	1	2	3	4	5	6	
	Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP						CV
Amostra	5,06	5,04	4,90	5,00	5,02	5,14	$5,02 \pm 0,08$ 1,56
Precisão intermediária							
	Dia 1	Dia 2	Two-way ANOVA: Analista		Two-way ANOVA: Dia		
Analista 1	5,00	5,06	F -calculado: 0,02		F -calculado: 5,14		
Analista 2	4,97	5,13	F -tabulated: 161,44		F -tabulated: 161,44		

Também foi possível atestar a exatidão do método. Este parâmetro foi avaliado através da comparação de cada uma das concentrações teóricas e reais, utilizando o teste t de Student assumindo variâncias iguais. Os resultados estão resumidos na tabela 23.

Tabela 23 - Resultados obtidos para o parâmetro exatidão.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Resultados			Média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP	Teste t
	1	2	3		
2,5	2,54	2,46	2,52	2,51 $\pm$ 0,04	<i>t</i> -calculated: 0,90 <i>t</i> -tabulated: 4,30
5	4,98	4,97	4,98	4,98 $\pm$ 0,01	<i>t</i> -calculated: 0,10 <i>t</i> -tabulated: 4,30
7,5	7,49	7,56	7,53	7,53 $\pm$ 0,04	<i>t</i> -calculated: 0,61 <i>t</i> -tabulated: 4,30

A partir do método otimizado e validado 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).

5.3. Estudo de compatibilidade fármaco-excipiente do sulfato de hidroxycloquina 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: glicolato de amido sócico (GAS) e lactose (LA). Todas as demais MB apresentaram variações na faixa de fusão do sulfato de HCQ isolado de menos de 2°C (Tabela 24). Já o GAS e a LA apresentaram os valores de 245,47°C e 220,03°C, respectivamente; caracterizando possíveis indícios de interação fármaco:excipiente. Estes, portanto, foram objetos de análises complementares.

Tabela 24 - Temperatura inicial (Tonset), temperatura do pico (Tpico) e temperatura final (Tendset) do evento de fusão, variação da entalpia (ΔH), Temperatura de degradação (Tdeg) e perda de Massa do sulfato de HCQ e 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_{pico}=264,82°C). Em contrapartida, o segundo evento demonstrou-se bastante diferente ao sobrepor os dois eventos consecutivos 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_{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 DSC 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.

Os resultados obtidos a partir da análise das cinco curvas termogravimétricas em diferentes razões de aquecimento, no método não isotérmico, forneceram valores de fator de frequência para o sulfato de HCQ e suas MB, que foram utilizados para aplicação da equação de Arrhenius (tabela 25).

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 isotermas do sulfato de HCQ foram: 230, 232, 235, 237 e 240°C; todas elas prévias as degradações do fármaco (1º evento de degradação) e 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 (Tabela 25) (PEREIRA et al., 2013).

Tabela 25 - Cálculos dos parâmetros cinéticos do sulfato de hidroxycloquina 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	$6,452 \times 10^{13}$	414

O espectro de IV da MB sulfato de HCQ-LA (Figura 26) 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 hidroxycloquina. 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 25), 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.

Os difratogramas obtidos confirmaram a existência de interação fármaco-excipiente para o GSA e a LA (Figura 27). 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 e com o amido foi confirmada pelo presente estudo (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Figura 26 - 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.

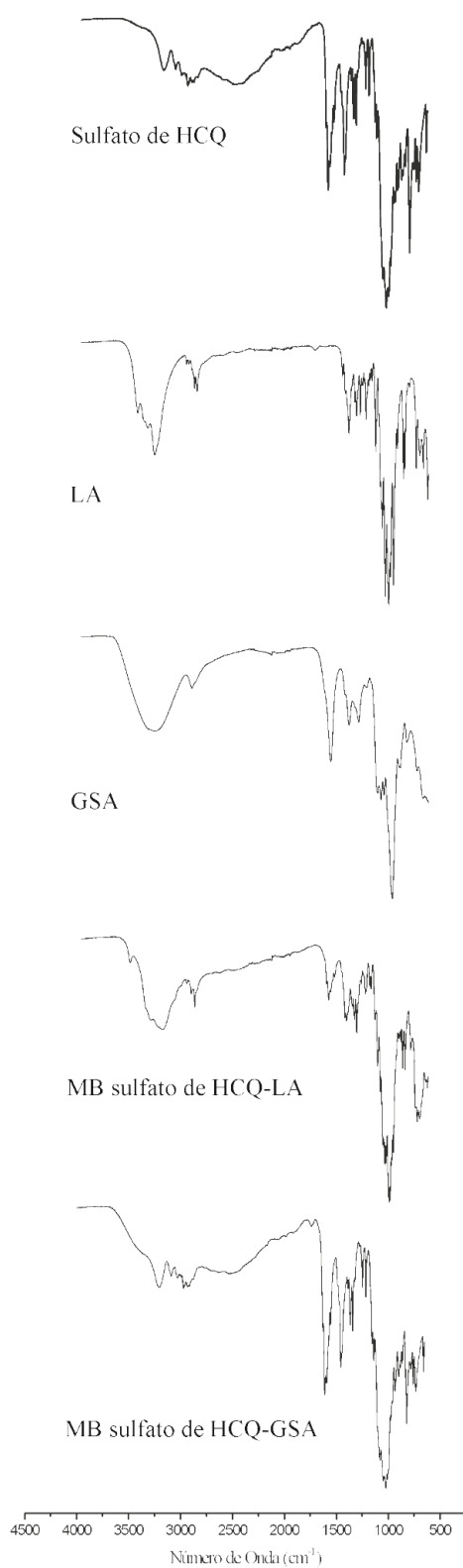
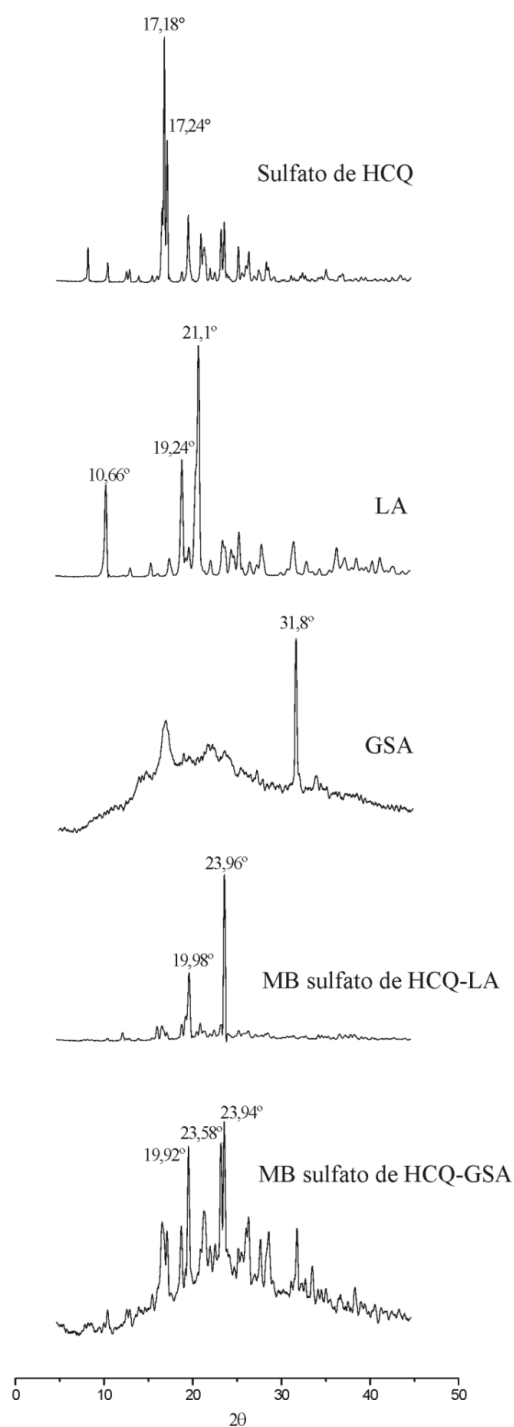


Figura 27 - Difrátogramas do sulfato de hidroxiclороquina e excipientes isolados e das misturas binárias do fármaco com a lactose e o glicolato de amido sódico.



5.4. Obtenção da forma farmacêutica

Durante a manipulação dos lotes de bancada, o extrato seco liofilizado de *B. trimera* mostrou-se sensível à umidade do ambiente, ocasionando dificuldades principalmente em relação ao escoamento da mistura dos pós.

O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado, apresentando excelentes resultados em formulações contendo produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2010). A partir da obtenção de uma mistura prévia do extrato seco com dióxido de silício coloidal, foi possível desenvolver a formulação sem que o mesmo apresentasse aderência às superfícies.

A associação do estearato de magnésio e talco como agentes reguladores de fluxo garantiu bons resultados e viabilizou o estudo reológico dos lotes de bancada. Como são insolúveis em água, estes excipientes são empregados, dentre diversas possibilidades, nas situações em que componentes ativos da forma farmacêutica apresentam propriedades higroscópicas (GINKGO BILOBA, 2001; VALERIANE, 1997).

Os resultados dos controles de qualidade dos lotes de bancada estão apresentados na tabela 26.

Tabela 26 - Controles de qualidade dos lotes pilotos de cápsulas contendo extrato seco de *B. trimera* e sulfato de hidroxiclороquina.

Ensaio	Especificações	LBI	BLII
Peso médio	0,322 g $\pm$ 7,50	0,323	0,322
Desintegração	Não mais que 45 min	8 min	11 min
Umidade (%)	Máximo 2,0%	0,4	0,8
Ângulo de repouso	$\leq 30^\circ$	5	17
Tempo de escoamento	≤ 10 s	1	5

Os resultados do peso médio e desintegração dos dois lotes de bancada manipulados atenderam as especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª edição para forma farmacêutica cápsulas.

Em relação ao teor de umidade, adotou-se o limite máximo de 2,0% especificado na Farmacopeia Americana para o sulfato de HCQ, e ambos os lotes apresentaram valores inferiores. É importante evitar que os produtos com extratos secos recebam umidade, pois geralmente são bastante higroscópicos, agindo a água como um catalisador para a degradação química e favorecendo o crescimento microbiano (MARQUES, 2005).

Embora os dois lotes obtidos tenham apresentado bons resultados de controle de qualidade, a formulação com amido parcialmente pregelatinizado apresentou menor desempenho reológico, pois reteve mais umidade e apresentou maior tempo de escoamento, levando a escolha de LBI como a formulação mais adequada para dar continuidade ao estudo.

Apesar do processo de gelatinização conferir melhor propriedade de fluxo ao amido, a menor fluidez do LBII é atribuída ao fato de que essas vantagens são perdidas quando adicionados de princípios ativos dotados de baixas propriedades de fluxo, como acontece com o extrato seco de *B. trimera*

Para dar continuidade a obtenção da forma farmacêutica, se faz necessário o desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento simultâneo do extrato de *B. trimera* e do sulfato de HCQ, assim como desenvolvimento de método de dissolução. Dessa forma, será possível afirmar definitivamente o LBI eleita formulação final.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- ✓ O teste de identificação confirmou a amostra disponível para o presente estudo como sendo da espécie *Baccharis trimera* (LESS.) DC.. Foi possível padronizar o teor de ácidos cafeicos na droga vegetal, a partir metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira; O material vegetal apresenta-se como pó semifino, em bom estado de conservação, indicando processo de secagem eficiente. O material também não apresenta excesso de contaminantes inorgânicos. Sendo, portanto, comprovadamente adequado para obtenção de produtos farmacêuticos;
- ✓ A prospecção fitoquímica revelou a presença de metabólitos anteriormente identificados por outros autores para matéria-prima vegetal;
- ✓ O extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. apresentou-se como um pó fino, de elevada área superficial e presença de mesoporos, com baixa capacidade de fluxo, demonstrando a necessidade da adição de excipientes que possibilitem a utilização do insumo para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas;
- ✓ A adaptação e validação de método analítico para doseamento do extrato seco permitiu padronizar o teor de ácidos cafeicos no extrato, viabilizando a utilização do mesmo no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas;
- ✓ A identidade do sulfato de HCQ pôde ser comprovada através da corroboração dos resultados obtidos das diversas metodologias aplicadas;
- ✓ O sulfato de HCQ demonstrou baixa solubilidade em solventes orgânicos. Em contrapartida, é facilmente solúvel em água e em soluções aquosas;
- ✓ O trabalho forneceu dados 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. O método otimizado mostrou-se mais eficiente em relação ao método de referência, pois reduziu o tempo de análise, o consumo de solventes, por redução do fluxo da fase móvel, e melhorou a resolução do pico no cromatograma. Uma maior atenção deve ser dada a estes resultados devido à ausência de monografia específica do sulfato de HCQ na Farmacopeia Brasileira;
- ✓ Neste estudo, 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;

- ✓ 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, evidenciando 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, o que significa que a decomposição térmica do insumo farmacêutico ativo não é influenciada por processos simultâneos;
- ✓ A forma farmacêutica desenvolvida apresentou boas características reológicas e baixo teor de umidade, condições ideais para manter a estabilidade de formulações que contém extrato de origem vegetal;
- ✓ Visando dar continuidade ao desenvolvimento da forma farmacêutica, a metodologia de doseamento simultâneo do extrato seco e do sulfato de HCQ e o método de dissolução ficam como perspectivas deste trabalho. Na sequência, serão realizados os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração do produto final.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

ABAD, M. J. et al. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **General Pharmacology**, Chieti, v. 32, n.4, p. 499-503, 1999.

AGUIRRE-CRUZ, L. et al. Torres KJ, Jung-Cook H, Fortuny C, Sa ´nchez E, Soda-Mehry A, et al. Short communication: preferential concentration of hydroxychloroquine in adenoid tissue of HIV-infected subjects. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.26, n.3, p.339-342, 2010.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS Ediciones S. R. L., 1998.

ALONSO, S. I. et al. Flora de un área de la Sierra La Barrosa (Balcarce) y fenología de especies con potencial ornamental. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, Mendoza, v.41, n.2, p.23-44, 2009.

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

ALVES, D. M. et al. Avaliação botânica da carqueja - *Baccharis trimera* (Less.) DC - como instrumento para o controle de qualidade de fitoterápicos. In: Mostra de Trabalhos de Iniciação Técnico-Científica, 11., 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2010.

AMARAL, A. S. et al. Rendimento de matéria seca e de óleo essencial de *Baccharis trimera* com adubação química e orgânica. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Santa Catarina, v.9, n.1, p.20-28, 2010.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v.46, p.328-346, 2002.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.3, p.230-234, 2000.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BASNET, P. et al. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Shibuya, v. 19, n. 11, p. 1479–1484, 1996.

BELLAMY, L. J.; NORDON, A.; LITTLEJOHN, D. Effects of particle size and cohesive properties on mixing studied by non-contact NIR. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 361, n.1-2, p.87-91, 2008.

BELTRAME, R. T. et al. Probability density function of the number of Embryos collected from superovulated Nelore breed donors. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.4, p.447-450, 2009.

BELTRAME, R. T. et al. Análise da produção de embriões na fertilização *in vitro* e transferência de embriões para doadoras Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.1, p. 21-27, 2010.

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

BONA, C. M. et al. Propagação de três espécies de carqueja com estacas de diferentes tamanhos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 179-184, 2004.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v.28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BORELLA, J.; FONTOURA, A.; MENEZES, JR. A. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera*(Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v.4, n.1, p. 99-102, 2001.

BORELLA, J.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v.12, n.2, p.63-67, 2002.

BORELLA, Júlio C. et al. m **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa , v.16, n. 4, 2006 .

BORGES, L. R. et al. Determinação de atividades biológicas em extratos de carqueja (*Baccharis trimera* (LESS) D.C.). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 2007.

BORGIO, J. et al. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.

BORTOLOTTI, L.A. Bases farmacológicas para a associação fixa de drogas. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 10, n. 4, p. 260-264, 2003.

BRAGA, T. V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, n.3 , p. 287 – 290, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa**. Brasília, Anvisa, 20 p., 2010.

BRITISH pharmacopeia. v. 2, London: Her Majesty's Stationery Office, 2008.

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

BROCKS, D.R.; PASSUTTO, F.M.; JAMALI, F. Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers. **Journal of Chromatography**, p.581:83-92, 1992.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, Salt Lake City, v.60, n.2, p. 309-19, 1938.

BUDEL, J. M. et al. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: Estudos botânicos. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, 15, n.3, p.268-271, 2005.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera*(Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.45, n.1, p.75-85, 2009.

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.1178–1182, 2012.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug Metabolism. **Journal of Chromatography**, v. 694, p.39-48, 1995.

CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. **Journal of Chromatography**, v. 719, p. 3-13, 1996.

CARAMORI, G. F; OLIVEIRA, K. T. Aromaticity: historical evolution of the concept and quantitative criteria”. **Química. Nova**, v. 32, 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**. 2006. 112f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. Herbivoria. **Ciência hoje.**, Rio de Janeiro, v. 20, n.118, p.35-39, 1996.

CARVALHO, R. I. N. et al. Enraizamento de estacas de carqueja em função de diferentes substratos e posições do ramo em plantas masculinas e femininas. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 269-274, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*)**. Viçosa: UFV, 2000. 102p.

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**, São Paulo, v.45, n.3, p.573-584, 2009.

CHIANG, G. et al. Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine. **Clinical Therapeutics**, v.18, n.6, p. 1080–1092, 1996.

CHUDA, Y. et al. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Tsukuba, v.44, n.8, p.2037–2039, 1996.

COELHO, M. P. G. et al. Antiarthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.154, n.1-2, p.69-80, 2004.

CONCEIÇÃO, M. M. **Estudo da degradação térmica de adoçante com aspartame**. 2004. 133 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

CORBACHO, M.I.; DAPUETO, J.J. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.1, p. 31-43, 2010.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, v.1, 747 p.

COSTA, R. S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

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. 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. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatology.**, v. 54, p.3284–90, 2006

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

DE SOUZA, K. C. B. et al. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.26, n.3, p.331-336, 2000.

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.

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.

DUCHARME, J. et al. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after oral of the racemate to healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, n.2, p.27-133, 1995.

ELMAN, A. et al. Chloroquine retinopathy in patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 5, p. 161-6, 1976.

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.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FESSLER, B.J. et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. **Arthritis & Rheumatology.**, v.52, n. 5, p.1473-80, 2005.

FIEGER, H.; IREDALE, J.; WAINER, IW. 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.

FRANCÈS, C. et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine in patients with refractory cutaneous lupus erythematosus: a French multicenter prospective study. **Archives of Dermatology**, 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. **Journal of Chromatography B**, v.689, p.91-104, 1997.

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

GAMBERINI, M. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis trimera*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86(supl. 2), p. 137-139, 1991.

GENÉ, R. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, n. 3, p. 232-235, 1996.

GINKGO BILOBA. Responsável técnico: Glauco Fernandes Miranda. Caxias do Sul: Laboratório farmacêutico vitamed ltda, 2001. Bula.

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.

GONGORA, L. et. al. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. **Life Sciences**, v. 71, n. 25, p. 2995-3004, 2002.

GONZALES, E. et. al. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 70, n. 3, p. 329-333, 2000.

GUSTAFSSON, L.L. et. al. The pharmacokinetics of (+)-and (-)-chloroquine in patients with rheumatoid arthritis [resumo]. In: 3ª Congresso Mundial em Farmacologia Clínica e Terapêuticas. Stockholm, Sweden, 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.

HENKIND, P.; ROTHFIELD, N.F. Ocular abnormalities in patients treated with synthetic antimalarial drugs. **The New England Journal of Medicine**, v.269, p.433-9, 1963.

BONFANTE, H. L., et al. Avaliação do Uso da Hidroxicloroquina no Tratamento da Osteoartrite Sintomática de Joelhos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.4, p. 208-212, 2008.

HOBBS, H.E.; SORSBY, A.; DREEDMAN, A. Retinopathy following chloroquine therapy. **Lancet**, v.2, p.478-80, 1959.

HOBBS, H.E; EADIE, S.P. Somerville F. Ocular lesions after treatment with chloroquine. **Br Journal of Ophthalmology**, v.45, n.4, p.284-97, 1961.

IREDALE J.; WAINER, I.W. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral—chiral high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 573, n.2, p.253-8, 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. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n.10, p.1827–30, 2010.

IZMIRLY, P.M. 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.

JOHANSSON, E.; FORSBERG, K.; JOHNSSON, 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. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.144, p. 174–177, 1979.

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

KHAN, K.A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **J Pharm Pharmacol.**, v. 27, p. 48-9, 1975

MARQUARDT, K., TIMOTHY, E. Albertson Treatment of hydroxychloroquine overdose. **American Journal of Emergency Medicine**, v.19, n.5, p. 420–424, 2001.

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. **Journal of Clinical Rheumatology**, v.3, n.1, p.3–8, 1997.

KLINGER G; MORAD Y; WESTALL C.A.; LASKIN C.; SPITZER K.A.; KOREN G.; ITO S.; BUNCIC R.J. Ocular toxicity and antenatal exposure to chloroquine or hydroxychloroquine for rheumatic diseases. **Lancet**, v. 358, n.9284, p. 813-4, 2001.

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. 136f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

LEMOS SENNA, E. et al. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 123-7, 1997.

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. **Química Nova**, v.24, n.5, p.683-88, 2001.

LIMA, A. A. et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzonidazole solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2443-51, 2011.

LINDNER, W. et al. Improved Enantiospecific RP-HPLC Assays for Propranolol in Plasma and Urine with Pronethalol as Internal Standard. **Journal of Analytical Toxicology**, v.15, n. 6, p.327-331, 1991

LOSQUI, Y. R. et al. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 290-97, 2009.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 59, n. 3, p. 657-61, 2000.

MAHLE, F. et al. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 265 - 271, 2007.

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

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.

MARQUES, L.C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 2, p.74-76, 2005.

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 Calouse Gulben Kian, 2001. p. 129-30.

MARTINEZ, M. J. A.; BESSA, A. L.; BENITO, P. B. Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). In: **Studies in Natural Products Chemistry**, Bioactive Natural Products (Part K), Amsterdam v. 30, 2007, p. 703-759.

MATSINGOU, T. C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLU, A. In vitro anti-oxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1060–1065, 2000.

MCCHESENEY, E.W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. **American Journal of Medicine**, v.75, p.11-8, 1983.

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

MCLACHLAN, A.J. et al. Disposition and absorption of hydroxychloroquine enantiomers following a single dose of the racemate. **Chirality**, v 6., n.4, p. 360-64, 1994.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological surveys of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.

MERCER, E. et al. Hydroxychloroquine improves insulin sensitivity in obese non-diabetic individuals. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, p. 135, 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. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, n. 4, p. 296–301, 2011.

MONTEIRO, R.D.C.; ZANINI, A.C. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 25-33, 2008.

MOORE, D.E; HEMMENS, V.J. Photosensitization by anti-malarial drugs. **Photochemistry and Photobiology**, v. 36, p. 71-77, 1982

MOORE, D.E.; TAMAT, S.R. Photosensitizing by drugs: photolysis of some chlorine-containing drugs. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 32, p. 172-77, 1980.

MORRIS, S.J. et al. Hydroxychloroquine use associated with improvement in lipid profiles in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Care & Research**, v. 63, n.4, p. 530–4, 2011.

MOTA, L.M.H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**; v.52, n.2, p.135-174, 2012.

MÜLLER, J. 2006. Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 76, p. 342, 2006.

MUNRO, R. Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 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**. 2001, 105f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

NERY, C. G. C. et al. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 44, n. 1, p. 61-73, 2008.

NEU, R. A New Reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, v. 43, p. 82, 1956.

O'DELL, J.R et al. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: a two-year, double-blind comparison of minocycline and hydroxychloroquine. **Arthritis & Rheumatology**, v.44, n.10, p. 2235–41, 2001.

OFORI-ADJEI, D. et al. Enantioselective analysis of chloroquine and desethylchloroquine after oral administration of racemic chloroquine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 8, n. 4, 457-61, 1986.

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465–469, 2005.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; LIMA-GOMES, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, T. O. et al. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as

oxidative species scavenger. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 601-607, 2011.

OLSEN, N.J. Schleich MA, Karp DR. Multifaceted effects of hydroxychloroquine in human disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.13, p.0049-0172, 2013.

PÁDUA, B. C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 381–386, 2010.

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 Medicine**, v.6, n.1, p.13–20, 2005.

PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, New York, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2009.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas Medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. São Paulo: Annablume/Fapesp, 2000, 216 p.

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.

PEDRAZZI, A. H. P. et al. Hematological evaluation of Carqueja (*Baccharis trimera*) infusion. **Fitoterapia**, v. 68, n. 1, p. 26-28, 1997.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)**. 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

PERON, A. P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L., em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p.127-130, 2008.

PETRI, M. et al. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. **American Journal of Medicine**, v.96, n.3, p. 254–9, 1994.

PINHO, D. S. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de Allium cepa e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, 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 & Rheumatology**, v.61, n.6, p.830–9. 2009.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; **Tecnologia Farmacêutica**, vol. 1.5ª ed.; Calouste Gulbenkian: Porto, 1995,

PROWSE, C.; PEPPER, D.; DAWES, J. Prevention of the platelet alpha-granule release reaction by membrane-active drugs. **Thrombosis Research**, v.25, n.3, p.219–27, 1982.

QUATRARO, A. Hydroxychloroquine in decompensated, treatment-refractory noninsulin-dependent diabetes mellitus. A new job for an old drug?. **Annals of Internal Medicine**, v. 112, n. 9, p.678-81, 1990.

RAHMAN, P. The cholesterol lowering effect of antimalarial drugs is enhanced in patients with lupus taking corticosteroid drugs. **The Journal of Rheumatology**, v.26, n.2, p. 325–30, 1999.

RAINES, M.F; BHARGAVA, S.K; ROSEN, E.S. The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.30, p. 1726-31,1989.

RETTA, D. et. al. Volatile constituents of five *Baccharis* Species from Northeastern Argentina. **Journal of the brazilian chemical society**, v.20, n.7, p.1379-1384, 2009.

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. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 41-5, 2008.

RODRIGUES, C. R. F. et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 97-101, 2009.

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. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, n.4, p. 297–308, 2007.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th edition. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association, 2009.

RUIZ, A. L. T. G. et al. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

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.

RUIZ-IRASTORZA G. et al. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n.1, p. 20-8, 2010.

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.

SAINI, B.; BANSAL, G. Characterization of four new photodegradation products of hydroxychloroquine through LC-PDA, ESI-MSn and LC-MS-TOF studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.84, p. 224-31, 2013.

SANTANA, G. P.; RAMOS, A. M.; FABRIS, J. D., An adapted magnetite synthesis strategy; **Química Nova**, v. 31, p. 430-432, 2008.

SANTOS, J. L. et al. Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 161-165, 2009.

SAVARINO A. et al. The anti-HIV-1 activity of chloroquine. **Journal of Clinical Virology**. v. 20, n.3, p. 131-5, 2001.

SCHEFFER-BASSO, S. M. et al. Morfofisiologia da rebrota de *Baccharis trimera*(Less) DC. Asteraceae: Subsídios para seu controle em pastagens naturais. **Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 31-37, 2008.

SCHMIDT, F. B.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Efeito da sazonalidade sobre o potencial antibacteriano de extratos etanólicos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 2, p. 1-5, 2008.

SCHNEIDER, A. A. **Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil.** 2009. 197f. Tese (Doutorado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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 DD. Quimioterapia das infecções por protozoários. In: Goodman LS; Gilman A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2006. p. 927-9.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos.** 1. ed. Santa Fé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.

SHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. **Planta Medica**, v. 60, n. 4, p. 360–364, 1994.

SILVA, F. G. et al. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 990-7, 2007.

SILVA, F.G. et al. Influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, 2010.

SILVA, R. M. F. ***Peperomia pellúcida* L. (H.B.K.): Obtenção de tecnologia de formas farmacêuticas**, 2010. 186f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora de UFSC, 2007. 1102 p.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis.**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.

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. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.4, p. 553-66, 2006.

SNYDER L.R, KIRKLAND J.J, GLAJCH J.L. Chiral Separation. In: **Practical HPLC method development**. 2. ed., New York, 1997. p. 537.

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.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, A. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 37–39, 1987.

SOLOMONS, T.W.G ; FRYHLE CB. **Química Orgânica**. v.I. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SOUSA, L. A. **Produtividade e nutrição em três acessos de *Baccharis trimera* em função da adubação organo-mineral, em casa de vegetação**. 2005. 42p. Dissertação - (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2005.

SPERBER, K. et al. Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. **Clinical Therapeutics**, v. 17, n.4, p. 622–36, 1995.

SPERBER, K. et al. Comparison of hydroxychloroquine with zidovudine in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Clinical Therapeutics**, v. 19, n.5, p. 913–23, 1997.

SWEETANA, S; AKERS, M.J. Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form development. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 50, n.5, p. 330-42, 1996,

TACHIBANA, K; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-88 , 2001.

TANENBAUM L, DENNY M, TUFFANELLI MD. Antimalarial agents. **Archives of Dermatology** , v. 116, p. 587-591, 1980.

TASCHETTO, A. P. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* frente ao microorganismo *Helicobacter pylori***. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento).

Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2010.

TETT, S.E. et al. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n.6, p. 771-79, 1989.

THE UNITED States Pharmacopoeia National 36. National Formulary 31: Rockville: 2013. p. 2592-3.

TIBOLA, A. P. O. V. **Estudo de compatibilidade entre a isoniazida e excipientes farmacêuticos. Dissertação** 2009. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

TIMMERMAN, B. N. et al. Constituents of *Chrysanthemum paniculatus* 3,4,5-O-[E]-tricafeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-O-[E]-dicafeoylquinic, 3,5-O-[E]-dicafeoylquinic and 4,5-dicafeoylquinic acids. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 365-368, 1983.

TØNNESEN, H. H et al. Photochemical stability of antimalarials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, p. 215-219, 1988.

TORRES, L. M. B. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 617-619, 2000.

UNIVERSITY OF ALBERTA. **Drugbank version 3.0**. 2013. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 05 maio 2013.

VALERIANE. Responsável técnico. Ilha do Governador: Química e farmacêutica NIKKHO do Brasil Ltda, 1997. Bula de remédio.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Carqueja. Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Corumbá: Embrapa, 2006.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERLEYSSEN, K; SANDRA, P. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16-17, p. 2798-33, 1998.

Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida associação em dose fixa à base do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (less.) DC. e do sulfato de hidroxiquina como alternativa terapêutica para o tratamento da artrite reumatoide

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 386 p.

WALLACE, DJ. Does hydroxychloroquine sulfate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? **Arthritis & Rheumatology**. 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 DM, Jakobiec FA, editors. **Principles and practice of ophthalmology: clinical practice**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994. p.3284-5.

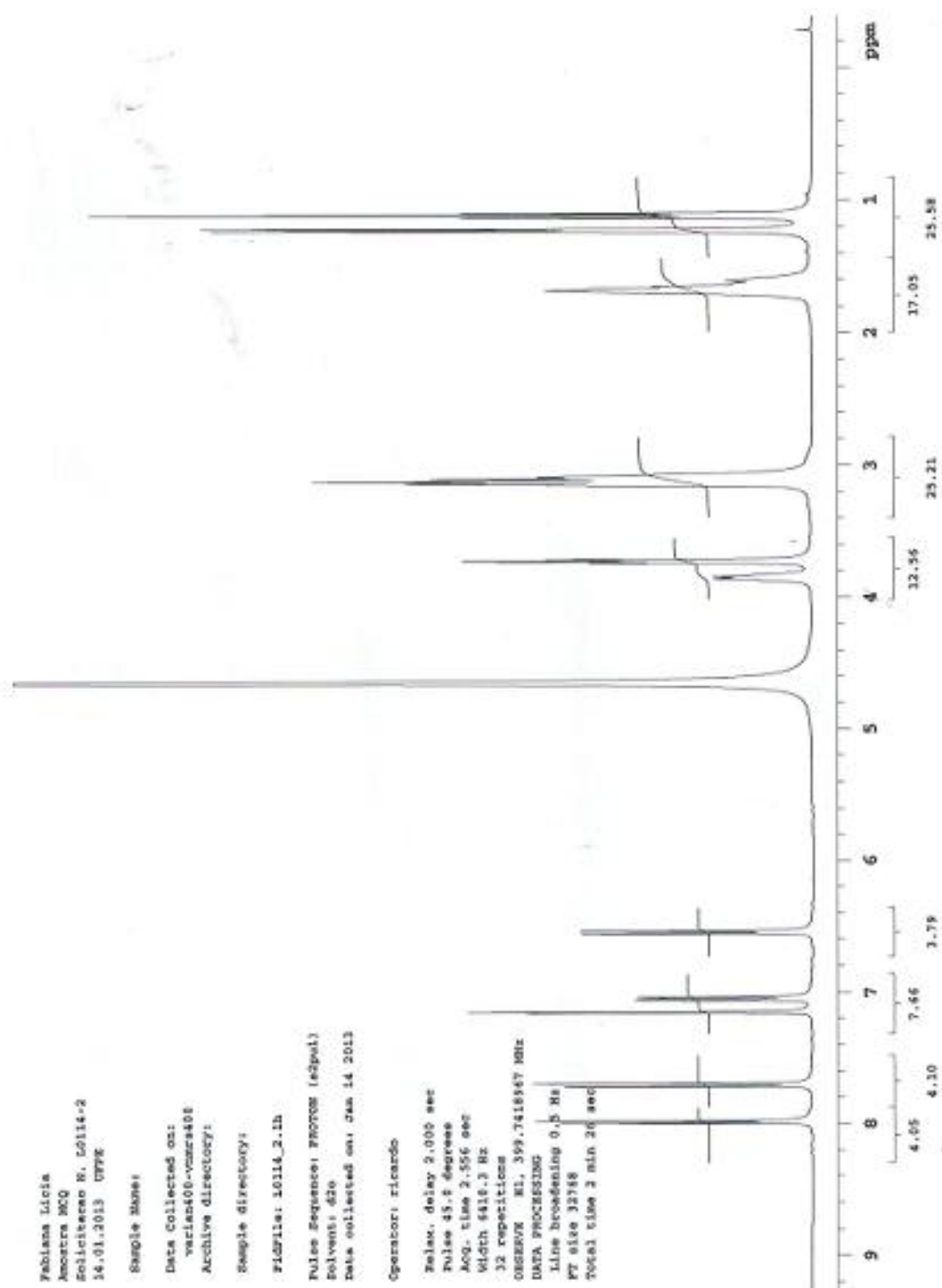
WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 143-145.

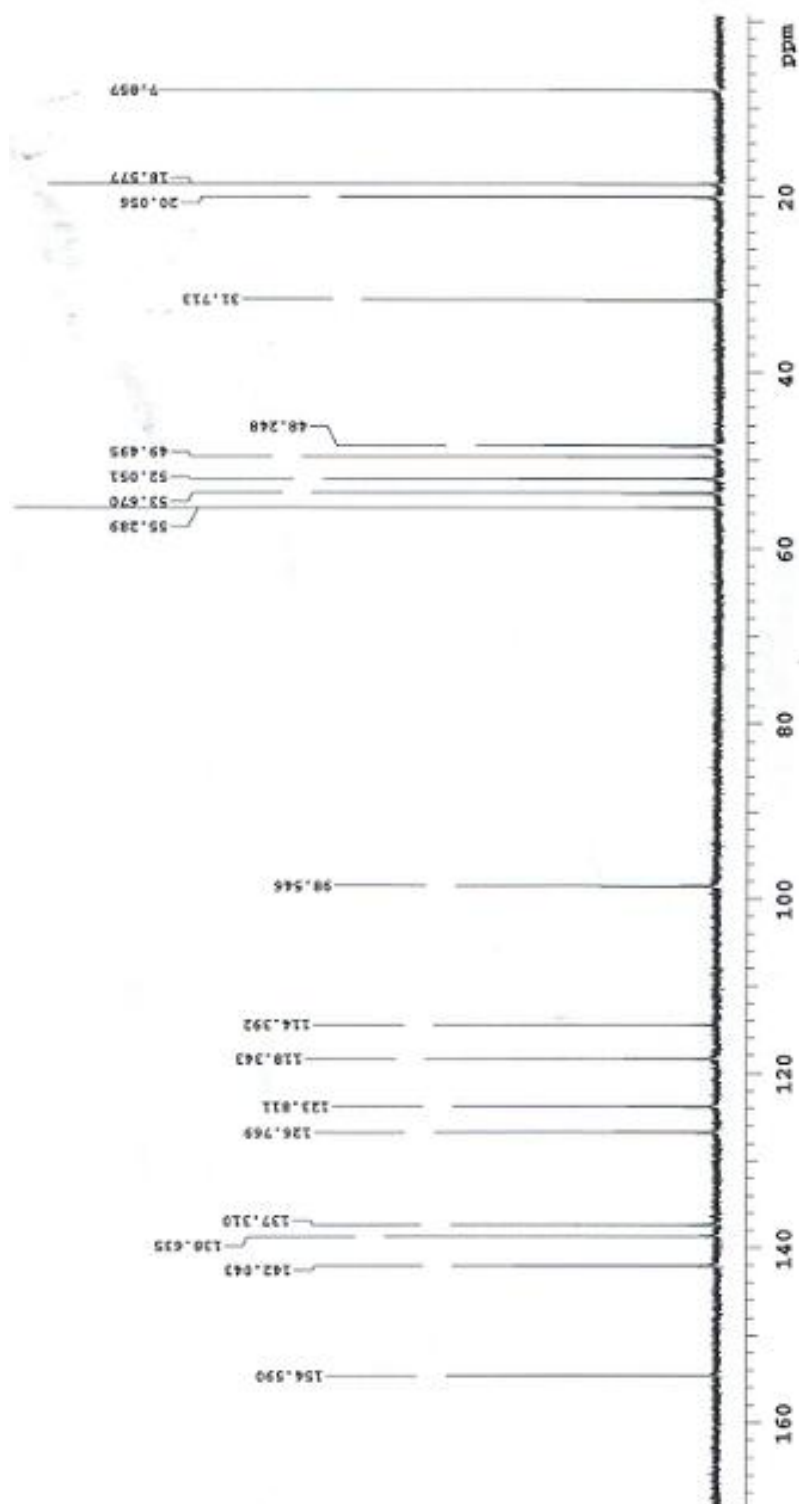
WOLFE, F.; MARMOR, M.F. Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care & Research**. v. 62, n. 6, p.775–84, 2010.

XAVIER, H.S. et al. Contribuição à caracterização dos taninos hidrolisáveis [resumo]. In: 53 Congresso Nacional de Botânica. Recife, p. 20, 2002.

ANEXOS



Espectros de RMN ^1H , ^{13}C , COSY E DEPT



PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.8 degrees Acq. time 1.285 sec Width 23510.2 Hz 2048 repetitions	OBSERVE C13, 100.5151802 DECOUPLE H1, 399.7438669 Power 41 dB continuously on MALTY-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 77 minutes	Fabiana ticla Amostra MCQ Solicitação N. 10114-2 14.01.2013 UFPE
Solvent: d1o Ambient temperature Operator: Ricardo			

Fabiana Licia
 Amostra MCQ
 Solicitacao N. I0114-2
 14.01.2013 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

Sample directory:

FidFile: COSY

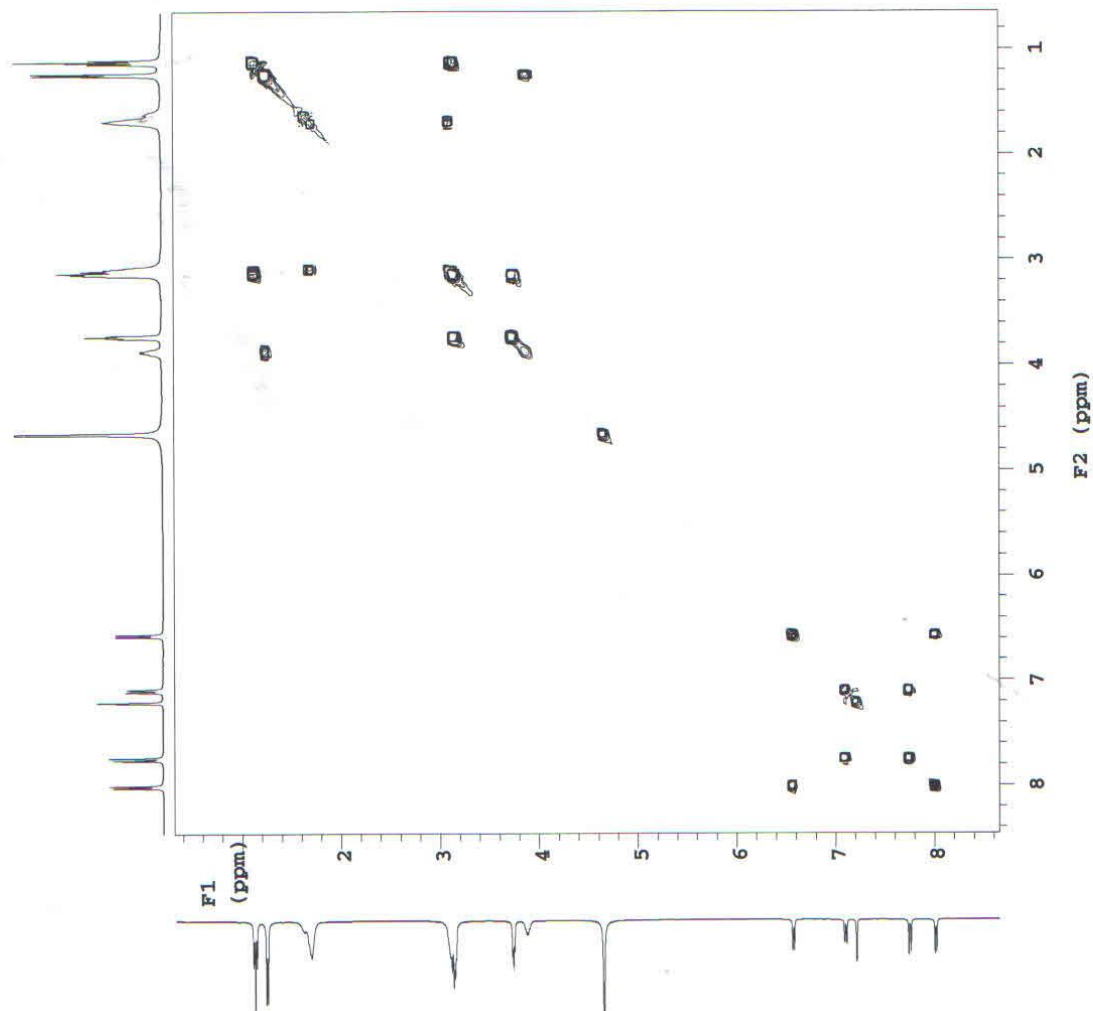
Pulse Sequence: COSY
 Solvent: d2o

Data collected on: Jan 18 2013

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Mixing 0.080 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 6410.3 Hz
 2D Width 6410.3 Hz
 2 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 399.7418994 MHz

DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.075 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.020 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 5 min 40 sec



Fabiana Licia
Amostra MCQ
Solicitacao N. L0114-2
14.01.2013 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmr400
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: COSY

Pulse Sequence: COSY

Solvent: d2o
Data collected on: Jan 18 2013

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Mixing 0.080 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6410.3 Hz
2D Width 6410.3 Hz
2 repetitions
128 increments

OBSERVE H1, 399.7418994 MHz

DATA PROCESSING

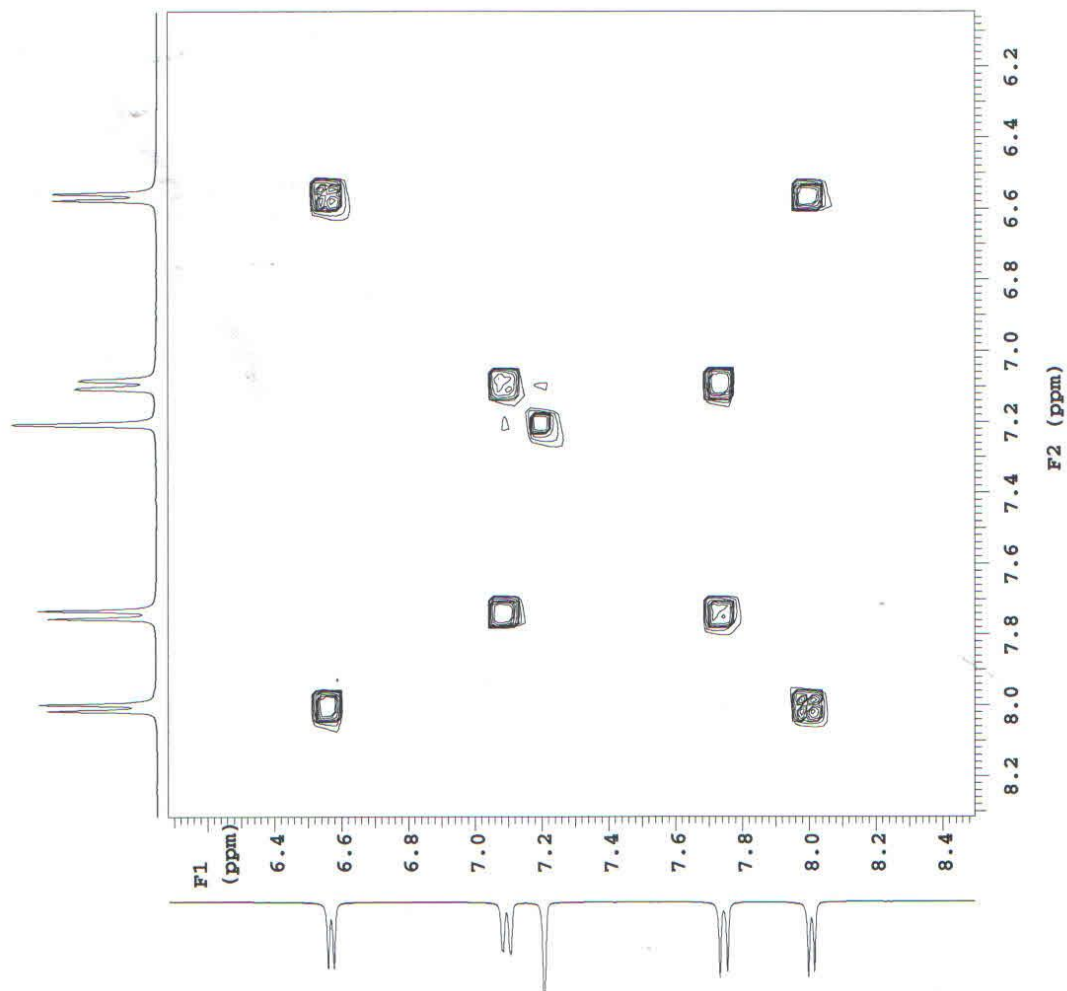
Sq. sine bell 0.075 sec

F1 DATA PROCESSING

Sq. sine bell 0.020 sec

Ft size 2048 x 2048

Total time 5 min 40 sec



Fabiana Licia
 Amostra MCQ
 Solicitacao N. 10114-2
 14.01.2013 UFPE
 Sample Name:
 Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:
 Sample directory:
 Fidfile: COSY
 Pulse Sequence: COSY
 Solvent: d2o
 Data collected on: Jan 18 2013
 Operator: ricardo
 Relax. delay 1.000 sec
 Mixing 0.080 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 6410.3 Hz
 2D Width 6410.3 Hz
 2 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 399.7418994 MHz
 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.075 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.020 sec
 F1 size 2048 x 2048
 Total time 5 min 40 sec

