

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE DA LEFLUNOMIDA**

**DIOGO DOS SANTOS MIRON**

**PORTO ALEGRE  
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO  
PRELIMINAR DE ESTABILIDADE DA LEFLUNOMIDA**

**Dissertação apresentada por Diogo dos Santos Miron  
para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval**

**PORTO ALEGRE  
2005**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13 de outubro de 2005 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M676v Miron, Diogo dos Santos  
Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade da leflunomida/Diogo dos Santos Miron. – Porto Alegre : UFRGS, 2005. – xx, 116 p.: il.

Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1.Validação: métodos de análise de fármacos. 2. Antiinflamatórios. 3. Leflunomida. 4. Controle de Qualidade de Medicamentos. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável: Margarida Maria C. F. Ferreira-CRB10/480.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação, apoio e estímulo em momentos difíceis e pela autonomia que foi confiada para desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do LEPCQ, em especial ao Prof. Dr. Martin Steppe pelas discussões e auxílio na solução de dúvidas; ao Prof. Ms. Tércio Oppe com quem desenvolvi meu primeiro trabalho no LEPCQ.

Aos funcionários do laboratório REBLAS: Lorena, Leila, Daniela e, em especial ao Clésio, que viabilizaram as análises por CLAE.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo auxílio e transferência de conhecimento.

Aos colegas e amigos do LEPCQ: Cristiane, Ana Rita, Cássia, Andreas, Lauren, Júlia, Juliana, Aline, Letícia e Jean, pela amizade e ambiente de trabalho sincero e agradável.

À Profa. Dra. Vera Lima e, em especial, ao mestrando Cedric pelo apoio nas etapas de síntese e obtenção dos espectros de IV.

Aos professores e funcionários do laboratório LAPS onde foram realizadas as análises de IV e ponto de fusão.

Ao Prof. Dr. Paulo Maiorga por viabilizar as análises por DSC e à mestranda Letícia e a funcionária Mariana que me acompanharam nas análises.

Ao Prof. Dr. Pedro Petrovick, diretor deste PPG, pelo apoio na conclusão deste trabalho.

Aos grandes amigos Germano e Marcio pela amizade e incentivo. Às amigas Aline Zimmer e Alessandra Soria pelas ricas discussões e sincera amizade. A todos amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho, em especial ao Farm. Derli Pinto.

À Vanessa Weissheimer pela força, compreensão, carinho e amor que têm sido muito importante em minha vida pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Lorenzo e Arianne e todos familiares pelo apoio, confiança, incentivo e amor dispensados.

Às queridas Tânia Miron Chiogna e Lara Miron pelo apoio incondicional e, principalmente, o amor afetuoso que nos torna especiais.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XV
RESUMO .....	XVII
ABSTRACT .....	XIX
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo Geral .....	7
2.2. Objetivos Específicos .....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
3.1 Artrite reumatóide .....	11
3.2 Leflunomida .....	13
3.3 Descrição .....	14
3.4 Apresentação .....	16
3.5 Mecanismo de ação e características farmacocinéticas .....	16
4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA LEFLUNOMIDA E DE SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO – METABÓLITO ATIVO A77 1726 .....	19
4.1 Introdução .....	21
4.2. Leflunomida Substância Química de Referência (SQR) .....	21
4.2.1. Determinação do ponto de fusão (PF) .....	21
4.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho (IV) .....	22
4.3. Leflunomida Substância de Trabalho (ST) .....	24
4.3.1. Extração da leflunomida a partir dos comprimidos de 20 mg .....	24
4.3.2. Caracterização da leflunomida ST por IV e CLAE .....	25
4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	26
4.3.3.1. RMN <sup>1</sup> H da leflunomida ST .....	27

## Sumário

---

4.3.3.2. RMN <sup>13</sup> C da leflunomida ST .....	28
4.4. A77 1726 .....	30
4.4.1. Síntese do A77 1726 .....	31
4.4.2. Caracterização e identificação do produto da reação .....	33
4.4.2.1. CLAE .....	33
4.4.2.2. DSC do A77 1726 .....	35
4.4.2.3. RMN <sup>1</sup> H do A77 1726 .....	36
4.4.2.3. RMN <sup>13</sup> C do A77 1726 .....	38
4.4.2.4. IV do A77 1726 .....	39
4.5. Conclusão .....	41
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	43
5.1. Introdução .....	45
5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	48
5.2.1. Parte Experimental .....	49
5.2.1.1. Equipamentos e reagentes .....	49
5.2.1.2 Condições cromatográficas .....	50
5.2.1.3 Validação .....	50
5.2.1.4 Preparo da solução estoque .....	51
5.2.1.5 Preparo da curva padrão .....	52
5.2.1.6 Preparo do placebo .....	52
5.2.1.7. Preparo da solução padrão .....	53
5.2.1.8. Preparo da solução dos comprimidos .....	53
5.2.1.9. Preparo da solução do placebo .....	54
5.2.1.10. Solução da leflunomida fotodegradada .....	54
5.2.1.11. Análise da pureza do pico .....	54
5.2.2. Resultados e Discussão .....	55
5.2.2.1. Desenvolvimento do método por CLAE .....	55
5.2.2.2. Estudo da estabilidade da solução estoque .....	56
5.2.2.3. Conformidade do sistema .....	57

## Sumário

---

5.2.2.4. Especificidade .....	59
5.2.2.5. Robustez .....	61
5.2.2.6. Linearidade .....	64
5.2.2.7. Limite de detecção .....	70
5.2.2.8. Exatidão .....	71
5.2.2.9. Precisão .....	72
5.2.3. Conclusão .....	73
5.3. Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta .....	74
5.3.1. Parte Experimental .....	75
5.3.1.1. Equipamento .....	75
5.3.1.2. Preparo da solução padrão .....	75
5.3.1.3. Preparo da curva padrão .....	76
5.3.1.3. Preparo da solução de comprimidos .....	76
5.3.1.4. Preparo da solução placebo .....	77
2.3.1.5. Validação .....	77
2.3.1.6. Condições do ensaio .....	78
5.3.2. Resultados e discussão .....	78
5.3.2.1. Desenvolvimento do método por espectrofotometria no UV .....	79
5.3.2.2. Robustez .....	84
5.2.2.3. Linearidade .....	85
5.3.2.4. Limite de detecção .....	88
5.3.2.5. Exatidão .....	88
5.3.2.6. Determinação do tempo de agitação para extração da leflunomida dos comprimidos .....	89
5.3.2.7. Precisão .....	89
5.3.2.7. Detecção de impureza na amostra .....	91
5.3.3. Conclusão .....	92
6. CAPÍTULO III - ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DA LEFLUNOMIDA .....	93
6.1. Introdução .....	95
6.2. Parte experimental .....	96



## Sumário

---

6.2.1. Técnica de análise .....	96
6.2.2. Preparação e degradação das amostras .....	96
6.2.2.1. Temperatura .....	96
6.2.2.2. Fotodegradação .....	96
6.3. Resultados e discussão .....	97
6.3.1. Degradação térmica .....	97
6.3.2. Fotodegradação .....	102
6.3. Conclusão .....	103
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 Procedimentos recomendados pela Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da AR ....	12
FIGURA 3.2. Estrutura química do fármaco leflunomida .....	14
FIGURA 3.3. Metabólito ativo da leflunomida – A77 1726 .....	15
FIGURA 3.4 Conformação e entalpia relativa de formação dos isômeros do A77 1726 .....	15
FIGURA 4.1. Espectro na região do IV da leflunomida SQR .....	23
FIGURA 4.2. Espectros na região do IV sobrepostos da leflunomida SQR e ST .....	25
FIGURA 4.3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da leflunomida ST em DMSO <sub>d6</sub> ....	27
FIGURA 4.4. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da leflunomida ST em DMSO <sub>d6</sub> ...	29
FIGURA 4.5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da leflunomida ST ampliado (116 – 129 ppm) .....	29
FIGURA 4.6. Representação esquemática da abertura do anel isoxazol e obtenção do A77 1726 .....	31
FIGURA 4.7. CCD utilizada para caracterização da reação de abertura do anel da leflunomida .....	32
FIGURA 4.8. Cromatograma do produto resultante da síntese do A77 1726 .....	34
FIGURA 4.9. Análise da pureza do pico do A77 1726 obtido por síntese. a) curva de similaridade; b) análise da pureza do pico utilizando 3 pontos .....	34
FIGURA 4.10. Curva de aquecimento obtida por DSC para o A77 1726 .....	35
FIGURA 4.11. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do A77 1726 em DMSO <sub>d6</sub> .....	36
FIGURA 4.12. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do A77 1726 em DMSO <sub>d6</sub> .....	38
FIGURA 4.13. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do A77 1726 ampliado (116 – 129 ppm) .....	38
FIGURA 4.14. Espectro de IV do A77 1726 .....	40
FIGURA 5.1. Cromatogramas de solução de leflunomida fotodegrada utilizando diferentes colunas. a) Coluna C <sub>18</sub> ; b) Coluna C <sub>8</sub> .....	55
FIGURA 5.2. Placebo. a) Cromatograma e espectros da solução placebo; b) cromatograma da solução diluente. ....	59

## Lista de Figuras

---

FIGURA 5.3. Pureza do pico da leflunomida. (a) Perfil da pureza do pico da leflunomida. (b) Cromatograma da leflunomida em solução fotodegradada por 60 h .....	61
FIGURA 5.4. Gráfico dos resíduos com possível outlier .....	65
FIGURA 5.5. Cromatograma do outlier .....	66
FIGURA 5.6. Representação gráfica da curva analítica da leflunomida por CLAE .....	68
FIGURA 5.7. Gráfico dos resíduos sem o outlier .....	68
FIGURA 5.8. Limite de detecção estimado visualmente (10,0 µg/mL)	70
FIGURA 5.9. Gráfico para determinação da faixa linear no UV da leflunomida .....	79
FIGURA 5.10. Espectros do UV convencional da leflunomida (10,5 µg/mL) e do placebo .....	80
FIGURA 5.11. Primeira derivada da SQR (10,5 µg/mL) e do placebo .	82
FIGURA 5.12. Representação gráfica da curva padrão da leflunomida pela $d^1$ .....	85
FIGURA 5.13. Gráfico dos resíduos da curva analítica da $d^1$ .....	86
FIGURA 5.14. Espectros de UV $d^1$ sobrepostos da leflunomida e leflunomida + A77 1726. a) 2% de A77 1726; b) 5% de A77 1726 .....	91
FIGURA 6.1. Cromatograma da degradação térmica (80 °C) dos comprimidos de leflunomida por 18 dias .....	97
FIGURA 6.2. Resultado da similaridade entre os espectros do ápice do pico do A77 1726 sintetizado e do primeiro pico do cromatograma de degradação térmica .....	98
FIGURA 6.3. Pureza dos picos observados na degradação térmica (18 dias; 80 °C). a) A77 1726; b) DT5; c) Leflunomida ...	99
FIGURA 6.4. Perfil de degradação térmico da leflunomida e do aparecimento dos produtos de degradação. Leflunomida em relação ao padrão e produtos de degradação em área percentual .....	100
FIGURA 6.5. Gráfico cinético de primeira ordem para degradação térmica da leflunomida .....	101
FIGURA 6.6. Cromatogramas da leflunomida fotodegradada com detecção em 214 e 254 nm .....	102
FIGURA 6.7. Resultados da fotodegradação da leflunomida .....	103

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Aspecto dos comprimidos de leflunomida .....	16
TABELA 4.1. Determinação do ponto de fusão da SQR .....	22
TABELA 4.2. Interpretação das principais bandas do espectro de IV da leflunomida SQR .....	23
TABELA 4.3. Resumo dos dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H da leflunomida ST em DMSO <sub>d6</sub> .....	28
TABELA 4.4. Resumo dos dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C da leflunomida ST em DMSO <sub>d6</sub> .....	30
TABELA 4.5. Resumo dos dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H do A77 1726 em DMSO <sub>d6</sub> .....	37
TABELA 4.6. Resumo dos dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C do A77 1726 em DMSO <sub>d6</sub> .....	39
TABELA 4.7. Interpretação das principais bandas do espectro de IV da leflunomida SQR .....	40
TABELA 5.1. Métodos de análise para determinação da leflunomida e/ou seu metabólito ativo encontrados na literatura .....	48
TABELA 5.2. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para determinação da leflunomida em comprimidos .....	50
TABELA 5.3. Adjuvantes farmacêuticos presentes nos comprimidos de leflunomida 20 mg (ARAVA <sup>®</sup> 20 mg) com suas respectivas funções e porcentagens propostas para elaboração do placebo .....	53
TABELA 5.4. Parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados .....	58
TABELA 5.5. Resultados do teste de robustez para método proposto por CLAE .....	62
TABELA 5.6. Variação das áreas do pico da leflunomida obtidas no teste de robustez .....	64
TABELA 5.7. Valores experimentais para curva padrão obtidos por CLAE, equação da reta calculada e coeficiente de correlação (r) .....	65
TABELA 5.8. Valores experimentais obtidos para curva analítica da leflunomida por CLAE sem o valor de influência .....	67
TABELA 5.9. Teste da análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear .....	69
TABELA 5.10. Resultados do estudo da exatidão por CLAE .....	71

## Lista de Tabelas

---

TABELA 5.11. Resultados da precisão por CLAE .....	72
TABELA 5.12. ANOVA dos resultados da precisão por CLAE .....	73
TABELA 5.13. Resultados para avaliação da influência dos excipientes na determinação da leflunomida no UV convencional .....	81
TABELA 5.14. ANOVA dos resultados para avaliação da influência dos excipientes na determinação da leflunomida no UV convencional .....	81
TABELA 5.15. Resultados da ANOVA e respostas da primeira derivada de soluções da SQR e SQR + placebo .....	82
TABELA 5.16. Resultados da determinação dos comprimidos de leflunomida pelas diferentes técnicas por UV e por CLAE .....	83
TABELA 5.17. Comparação, pelo teste t pareado, das determinações dos comprimidos de leflunomida pelas técnicas de UV contra o método de CLAE .....	83
TABELA 5.18. Resultados da robustez para o método da $d^1$ .....	84
TABELA 5.19. Valores experimentais obtidos para curva padrão da SQR pela $d^1$ .....	85
TABELA 5.20. Teste da análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da curva analítica da $d^1$ .....	87
TABELA 5.21. Resultados do estudo da exatidão pela $d^1$ .....	88
TABELA 5.22. Determinação do tempo de agitação para extração da leflunomida dos comprimidos .....	89
TABELA 5.23. Resultados da precisão por $d^1$ .....	90
TABELA 5.24. ANOVA dos resultados da precisão pela $d^1$ .....	90
TABELA 6.1. Resultados da degradação térmica dos comprimidos de leflunomida .....	100
TABELA 6.2. Resultados da fotodegradação da leflunomida. Percentual de leflunomida obtido através de comparação com padrão em 254 nm .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila  
ANOVA – Análise de Variância  
AR – Artrite Reumatóide  
BPFM – Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos  
BV – Balão Volumétrico  
CCD – Cromatografia em Camada Delgada  
CDER – Center for Drug Evaluation and Research  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
 $d^1$  – primeira derivada  
DMSO<sub>d6</sub> – Dimetilsulfóxido deuterado  
DPR – Desvio Padrão Relativo  
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial  
FDA – Food and Drug Administration  
FMCD – Fármacos Modificadores do Curso da Doença  
gl – graus de liberdade  
ICH – International Conference on Harmonization  
IV – Infravermelho  
 $k'$  - Fator de Retenção  
N – Número de Pratos Teóricos  
p – probabilidade  
PF – Ponto de Fusão  
PLA2 – Fosfolipase A<sub>2</sub>  
POP – Procedimento Operacional Padrão  
QM – Quadrado Médio  
r – coeficiente de correlação de pearson  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13  
RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio  
R<sub>s</sub> – Resolução  
SQ – Soma dos Quadrados  
SQR – Substância Química de Referência  
ST – Substância de Trabalho  
TF – Assimetria  
t<sub>r</sub> – Tempo de Retenção  
UV – Ultravioleta  
USP – The United State Pharmacopeia

## RESUMO

A leflunomida é um pró-fármaco anti-reumático encontrado na forma de comprimidos revestidos com nome comercial ARAVA<sup>®</sup> que, *in vivo*, é rápida e extensamente convertida a seu metabólito ativo A77 1726. Considerando a ausência de metodologia de controle de qualidade na literatura para a leflunomida, foram desenvolvidos métodos de caracterização e quantificação da leflunomida matéria-prima e na forma de comprimido, além de estudo preliminar de sua estabilidade. As técnicas de ponto de fusão, espectroscopia no IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e CLAE associada a detector de arranjo de diodos foram utilizadas para identificação e caracterização da leflunomida. O A77 1726 foi sintetizado e caracterizado pelas técnicas de espectroscopia no IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, CLAE e DSC. Foi desenvolvido e validado método analítico para quantificação da leflunomida em comprimidos por CLAE utilizando coluna C<sub>18</sub>, ACN:água (50:50) como fase móvel e detecção em 254 nm. O método apresentou parâmetros cromatográficos adequados e parâmetros de desempenho analítico satisfatórios, com limite de detecção de 10 ng/mL. Método por espectroscopia derivada no UV foi desenvolvido e validado como alternativa para quantificação da leflunomida em comprimidos. A comparação do método por UV derivada com a CLAE, para determinação da leflunomida em comprimidos, mostrou que os métodos são intercambiáveis, creditando a técnica de UV para testes de controle de qualidade de rotina. Foram realizados estudos de degradação forçada dos comprimidos de leflunomida submetendo amostras à temperatura de 80 °C ou exposição à radiação UV a 254 nm com lâmpada germicida. O principal produto de degradação encontrado foi o A77 1726. Além disso, outro produto de degradação, com tempo de retenção de 5,5 min (CLAE), apresentou quantidades significativas no estudo de degradação térmica.

**Palavras-chave:** leflunomida, A77 1726, validação de métodos analíticos, detector de arranjo de diodos, espectroscopia derivada no UV, degradação forçada.

## ABSTRACT

### VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS AND PRELIMINARY STABILITY STUDY OF LEFLUNOMIDE

Leflunomide (ARAVA<sup>®</sup>) is an antirheumatic prodrug available as coated tablets, which is rapidly and extensively metabolized to its active metabolite A77 1726. The lack of methodology in literature for leflunomide quality control gave rise to development and validation of methods to characterize and quantifies this drug on bulk and tablet dosage form. Moreover, stress testing was carried out to evaluate its stability. Leflunomide was characterized by following techniques: melting point, IR spectroscopy, NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, and HPLC coupled with diode-array detection. A77 1726 was synthesized and afterward characterized by IR spectroscopy, NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, HPLC and DSC. HPLC analytical method was developed and validated to determinate leflunomide in tablets, using reversed-phase column C<sub>18</sub>, mobile phase ACN:water (50:50) and UV detection set at 254 nm. This method shows suitable chromatographic parameters and appropriate analytical performance characteristics with 10 ng/mL detection limit. Derivative UV method was developed and validated as an alternative to quantify leflunomide in tablets. The resulting data of tablets determination by HPLC and derivative UV methods were similar, proving that UV derivative can be used as quality control routine method. Samples of leflunomide tablets were exposed to UV light (254 nm) and thermal treatment at 80 °C. The mainly degradation product founded was A77 1726. Another important thermal degradation product was detected with retention time of 5,5 min (HPLC).

**Key words:** leflunomide, A77 1726, validation of analytical methods, diode array detector, UV derivative spectroscopy, stress testing.



---

## 1. INTRODUÇÃO

---



A validação de ensaios de controle de qualidade é essencial na fabricação de produtos farmacêuticos, registro de novos medicamentos, bem como em laboratórios de controle de qualidade, pois é uma ferramenta que assegura e permite realizar a análise de insumos e produtos farmacêuticos com confiabilidade. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária 210/03, os estudos de validação constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM) e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos. Além disso, deve ser mantido relatório com o resumo dos resultados obtidos e conclusões (BRASIL, 2003a).

O principal objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e a responsabilidade de identificar parâmetros relevantes, elaborar um protocolo de validação e estipular critérios de aceitação são inteiramente do analista. A exatidão e confiabilidade dos resultados analíticos são cruciais para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Conseqüentemente, a validação de métodos analíticos tem estado em foco e é uma exigência de agências reguladoras da área farmacêutica. No entanto, um método bem caracterizado também é essencial sob perspectiva financeira, pois os dados analíticos são a base de muitas decisões como liberação de lote e estabelecimento/verificação do prazo de validade (CARTESEN; RHODES, 2000).

A leflunomida é um pró-fármaco usado no tratamento da artrite reumatóide como agente imunomodulatório por impedir a proliferação dos linfócitos T ativados, através da inibição da síntese *de novo* da pirimidina (RUCKEMANN, 1998). Foi obtida em um programa de desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios da empresa alemã Hoechst na década de 1980 (FOX et al., 1999). Trata-se de um derivado do isoxazol que estruturalmente não é relacionado a nenhum fármaco anti-reumático. Após administração oral, a leflunomida é rápida e extensamente convertida a seu metabólito ativo A77 1726, o qual é responsável pelas atividades *in vivo* (USHIPAR, 1998).

Comercialmente é encontrada na forma de comprimidos para administração oral de 10, 20 e 100 mg com nome ARAVA<sup>®</sup> (USHIPAR, 1998). É comercializado pela empresa francesa Aventis Pharmaceuticals, porém as patentes relacionadas à obtenção da leflunomida e uso como anti-reumático são da empresa alemã Hoechst e, além disso, a obtenção e uso do metabólito também estão protegidos por patente que expira em 21 de outubro de 2014 (HOESCHST, 1994).

No que diz respeito à avaliação do fármaco, foram encontrados na literatura métodos, por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), para determinação da leflunomida e/ou seu metabólito ativo A77 1726 em fluídos biológicos, cultura de células e produtos de síntese. Porém, não é relatado método para determinação do fármaco na forma farmacêutica comprimido, o que fortalece a importância deste estudo.

---

## 2. OBJETIVOS

---



## **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliar qualitativa e quantitativamente o fármaco leflunomida na forma farmacêutica comprimido e realizar estudo preliminar de sua estabilidade.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar e caracterizar a leflunomida substância química de referência (SQR) com auxílio de técnicas de análise adequadas;
- Extrair a leflunomida dos comprimidos comerciais para obtenção de leflunomida substância de trabalho (ST);
- Identificar e caracterizar a leflunomida ST com auxílio de técnicas de análise apropriadas;
- Desenvolver e validar método para identificação e quantificação da leflunomida em comprimidos comerciais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver e validar método para identificação e quantificação da leflunomida por espectrofotometria derivada no ultravioleta;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade térmica e fotoestabilidade da leflunomida;





---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



### 3.1 Artrite reumatóide

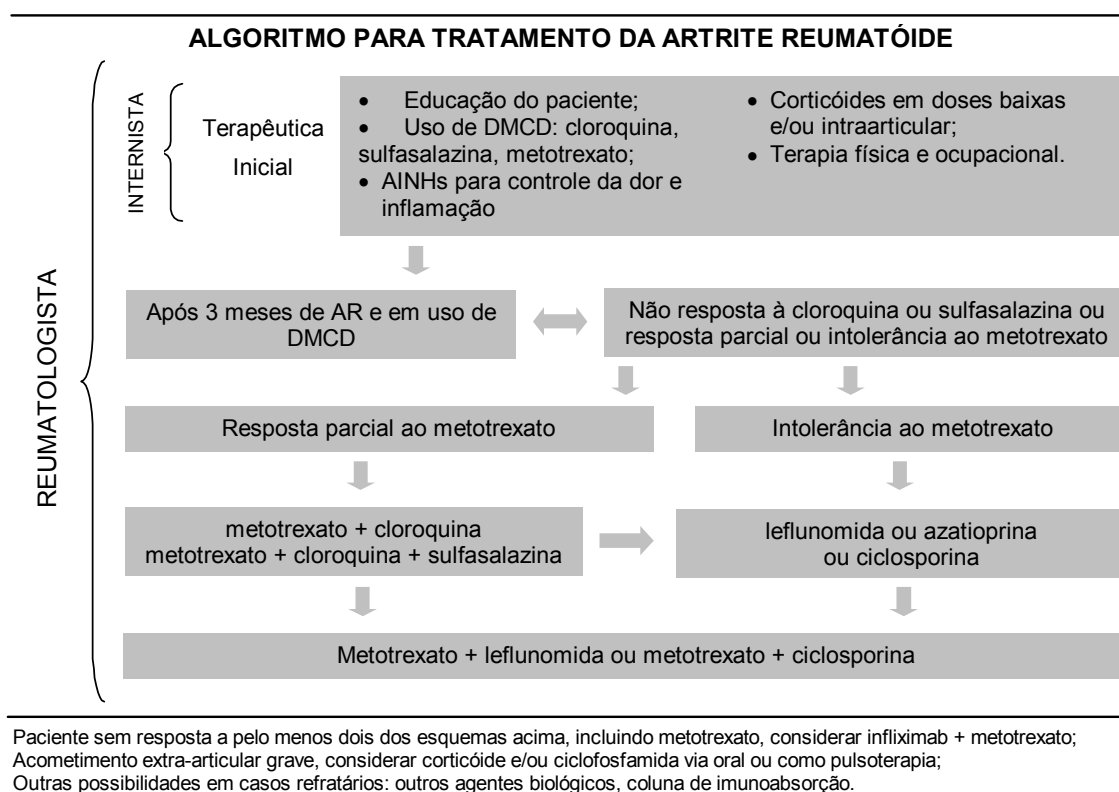
A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune de etiologia desconhecida, caracterizada pela inflamação não purulenta das articulações sinoviais (SCUTELLARI; ORZINCOLO, 1998). Os principais sintomas são: dor, inchaço e sensibilidade nas articulações que causam dificuldade para locomoção. A maioria dos pacientes apresenta rigidez matinal, fraqueza, fadiga, anorexia e conseqüente perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em 5 a 10 anos (LIPSKI, 1998). Com a progressão da doença, os pacientes com AR desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária quanto profissional, com impacto significativo para o paciente e sociedade (LAURINDO et al, 2002).

A prevalência da AR é aproximadamente de 0,8% da população (variação de 0,3 a 2,1%). As mulheres são, aproximadamente, três vezes mais afetadas que os homens. A prevalência aumenta com a idade, e a diferença entre sexos diminui nos idosos. A AR afeta todas as raças e o começo da doença é mais freqüente durante a quarta e quinta década de vida, com 80% dos pacientes desenvolvendo a doença com idade entre 35 e 50 anos (LIPSKY, 1998).

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível (LAURINDO et al., 2002). Os objetivos principais do tratamento do paciente incluem: a redução da dor e da inflamação; manutenção das habilidades funcionais; redução na taxa de progressão da doença; e prevenção de efeitos adversos causados pela terapia medicamentosa (DESOKY, 2001).

A terapêutica do paciente varia de acordo com o estágio da doença, sua atividade e gravidade, devendo-se ser mais agressivo no tratamento quanto mais agressiva for a doença. Para o controle da dor e do processo inflamatório articular,

é recomendado o uso de antiinflamatórios não esteróides (AINE) que devem ser mantidos enquanto se observa sinais inflamatórios e/ou dores articulares. Doses baixas de glicocorticóides (até 15 mg/dia de prednisona) podem ser usadas em pacientes com doença de difícil controle ou enquanto se aguarda a ação de fármacos modificadores do curso da doença<sup>1</sup> (FMCD). FMCD devem ser indicados logo no início do tratamento para todos os pacientes com diagnóstico estabelecido e mantidos indefinidamente (Figura 3.1). Exemplos de FMCD incluem, metotrexato, sulfasalazina, hidroxicloroquina, ciclosporina, sais de ouro, penicilamina, azatioprina e a mais nova delas, leflunomida. A ação esperada destes agentes é a diminuição dos sinais de progressão da doença, verificada através de radiografias.



**FIGURA 3.1. Procedimentos recomendados pela Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da AR.**

Fonte: LAURINDO *et al*, 2002.

<sup>1</sup> FMCD – sinônimo de DMCD (Droga Modificadora do Curso da Doença) na Figura 3.1.

A terapia combinada de FMCD tem demonstrado ser mais benéfica e menos perigosa que a monoterapia. Para pacientes com resposta negativa para mais de uma FMCD, tem-se a alternativa do uso de agentes biológicos (ou novos FMCD) como etanercept<sup>®</sup> e infliximab<sup>®</sup>. Embora a eficácia clínica e aparente segurança dos agentes biológicos terem sido demonstradas em ensaios clínicos com até dois anos de duração, é conveniente que estes sejam usados apenas em casos extremos até que a segurança em longo prazo seja comprovada. Além disso, o custo e a administração via parenteral limitam a utilização destes (LAURINDO et al., 2002; DESOKY, 2001).

### **3.2 Leflunomida**

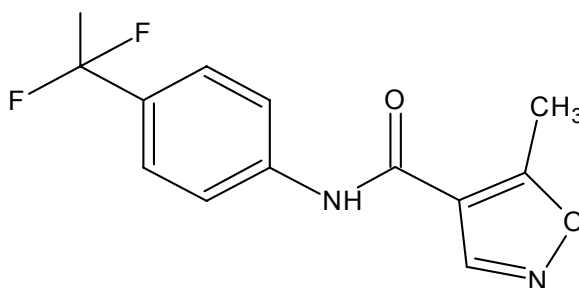
A literatura sugere que a estrutura básica da leflunomida foi originada de um projeto de pesquisa de herbicidas agrícolas (FOOD, 1998). Modificações químicas e ensaios de atividade levaram ao desenvolvimento da leflunomida. Originalmente, a leflunomida foi desenvolvida como um agente antiinflamatório porém, devido a sua atividade imunomodulatória acabou encontrando uso no tratamento de doenças auto-imunes (FOX et al., 1999). O principal efeito farmacológico deste pró-fármaco está relacionado à inibição da síntese de pirimidina que impede a proliferação dos linfócitos. No entanto, a inibição da tirosina quinase e da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) podem contribuir para eficácia da leflunomida (FOX et al., 1999; HOECHST, 1998).

Em março de 1998 a leflunomida foi submetida à aprovação do Food and Drug Administration (FDA) como um novo fármaco, pela Hoechst Marion Roussel. Em 10 de setembro do mesmo ano foram aprovados os comprimidos de ARAVA (Leflunomida) de 10, 20 e 100 mg, para o tratamento de adultos com artrite reumatóide por reduzir os sinais e sintomas da doença e retardar as erosões ósseas e o estreitamento do espaço entre as articulações, evidenciados por raio-X (FOOD, 1998). Recentemente, em junho de 2003, a leflunomida recebeu

expansão de indicação, pelo FDA, sendo utilizada para melhoria das funções (habilidades) físicas dos pacientes com AR. Esta nova indicação reforça a significância dos benefícios associados ao tratamento com ARAVA<sup>®</sup> (AVENTIS, 2003).

### 3.3 Descrição

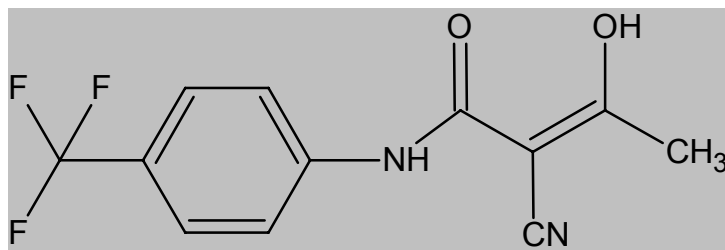
Quimicamente, leflunomida é N-[(4-trifluorometil)fenil]-5-metilisoxazole-4-carboxamida, que possui os seguintes sinônimos: HWA486 e SU101, além do nome comercial ARAVA. Possui número de registro CAS 75706-12-6, peso molecular de 270,2 e pKa igual a 10,8 a 23 °C. Apresenta-se como um pó cristalino branco com duas formas polimórficas<sup>2</sup>; ponto de fusão 166,5 °C; é praticamente insolúvel em água e solúvel em metanol, etanol, isopropanol, acetato de etila e acetonitrila. (HOECHST, 1998; HOECHST, 1979). Sua fórmula empírica é C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a estrutura química está ilustrada na Figura 3.2 (HOECHST, 1998; GRAUL; CASTANER, 1998).



**FIGURA 3.2. Estrutura química do fármaco leflunomida.**

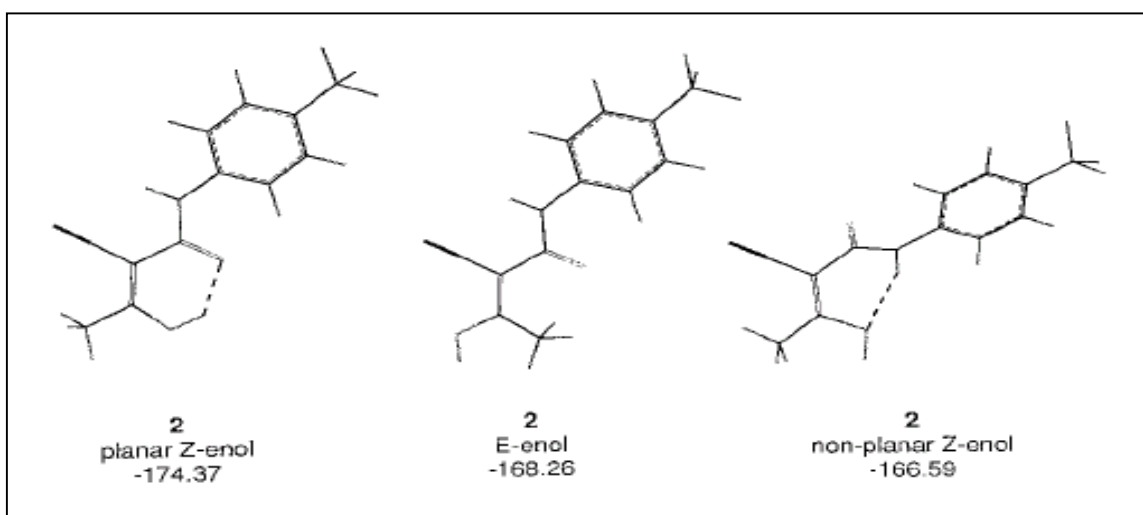
A leflunomida é um derivado do isoxazol que estruturalmente não é relacionado a nenhum fármaco anti-reumático. Trata-se de um pró-fármaco que é rapidamente convertido, *in vivo*, em seu metabólito ativo A77 1726, também encontrado como SU0020 ou 2-ciano-3-hidróxi-N-[4-(trifluorometil)fenil]but-2-enamida (Figura 3.3).

<sup>2</sup> A literatura não diferencia o ponto de fusão das formas polimórficas.



**FIGURA 3.3. Metabólito ativo da leflunomida – A77 1726**

A conformação estrutural do A77 1726 foi caracterizada por cristalografia de raio-X que determinou sua estrutura como praticamente planar, com o grupo carbonila da amida formando forte ligação de hidrogênio intramolecular com o grupamento hidroxila enólico. Assim, fica caracterizada a configuração Z do grupamento enol que favorece a formação de um anel de seis membros estabilizado pela ligação de hidrogênio intramolecular enol – carbonila da amida. A geometria Z é preferida por 6 Kcal/mol à conformação E-enol, onde a ligação de hidrogênio intramolecular não é possível de ser formada, e aproximadamente 8 Kcal/mol à outra conformação Z-enol onde a ligação de hidrogênio forma um anel de seis membros não planar (Figura 3.4). Além disso, a presença possível de tautomerismo ceto-enólico em solução foi descartada pela análise por RMN em DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O que não evidenciou a presença de cetona ou mistura de isômeros (BERTOLINI et al., 1997; PAPAGEORGIU et al., 1997).



**FIGURA 3.4. Conformação e entalpia relativa de formação dos isômeros do A77 1726.**

### 3.4 Apresentação

Os comprimidos de leflunomida (ARAVA<sup>®</sup>) de 10 e 20 mg são acondicionados em frascos e os de 100 mg em blíster e devem ser estocados a temperatura ambiente e protegidos da luz. A Tabela 3.1 apresenta os aspectos dos comprimidos de leflunomida. No Brasil são comercializadas as doses de 20 e 100 mg.

**TABELA 3.1. Aspecto dos comprimidos de leflunomida.**

Dose (mg)	Quantidade	Descrição
10	30 ou 100 comprimidos	Comprimido branco, circular, revestido, com “ZBN” gravado em uma das faces
20	30 ou 100 comprimidos	Comprimido amarelo luminoso, triangular, revestido, com “ZBO” gravado em uma das faces
100	3 comprimidos	Comprimido branco, circular, revestido com “ZBP” gravado em uma das faces

### 3.5 Mecanismo de ação e características farmacocinéticas

ARAVA<sup>®</sup> é usado no tratamento da AR como agente imunomodulatório por impedir a proliferação dos linfócitos T ativados, através da inibição da enzima diidroorotato desidrogenase (RUCKEMANN, 1998). A leflunomida é um pró-fármaco e a inibição da enzima é creditada ao metabólito ativo A77 1726 (FOX et al., 1999; GOLDENBERG, 1999).

A leflunomida, após administração oral, é convertida em seu principal metabólito A77 1726 o qual é responsável pela atividade *in vivo* (USHIPAR, 1998). A leflunomida foi desenvolvida como um pró-fármaco com a intenção de reduzir a irritação gastrointestinal causada pelo metabólito ativo que tem sido administrado por via intravenosa em protocolos de imunossupressão. A conversão da leflunomida em seu metabólito ativo acontece rapidamente e após 6 h de infusão



as concentrações plasmáticas de A77 1726 são 100 vezes maiores que do pró-fármaco (DIAS et al., 1995). FOX e colaboradores (1999) afirmam que a conversão da leflunomida em A77 1726 ocorre, predominantemente, através de reação não-enzimática na mucosa intestinal e no plasma, porém frações hepáticas citosólicas e microsossomais têm demonstrado serem locais de metabolismo em menor extensão.

Com relação aos metabólitos em menor quantidade no plasma, apenas o 4-trifluormetilanilina é quantificável (HSIEH, 1995; USHIPAR, 1998; ZHANG et al., 2002).

---

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



O controle de qualidade está integrado a todos processos industriais modernos e a indústria farmacêutica mundial emprega equipamentos e técnicas sofisticadas para desenvolver e garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Neste contexto, fica clara a necessidade de interdisciplinaridade e colaboração de diversas áreas do conhecimento para o estudo adequado de produtos farmacêuticos. Estes aspectos foram fundamentais para execução deste trabalho que contou com staff e equipamentos qualificados, com destaque para o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) e o laboratório da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos (REBLAS), desta Universidade.

O desenvolvimento de métodos e a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos constituem linhas de pesquisa deste Programa de Pós-Graduação (PPG), o que viabilizou o desenvolvimento dos métodos de caracterização e quantificação da leflunomida, além do estudo preliminar de sua estabilidade.

Os parâmetros de desempenho analítico apresentaram resultados satisfatórios para os métodos analíticos desenvolvidos (CLAE e UV d<sup>1</sup>), podendo-se considerar ambos os métodos validados, com aplicação na quantificação da leflunomida em comprimidos. Além disso, os estudos pré-validação mostraram-se fundamentais para obtenção de métodos capazes de gerar resultados confiáveis.

O estudo de degradação forçada, apesar de breve, foi capaz de identificar dois potenciais produtos de degradação da leflunomida e abre a perspectiva de trabalho mais extenso sobre a estabilidade do fármaco em questão.

Espera-se que os resultados e discussões deste trabalho contribuam como material de apoio para novos estudos na área. A leflunomida não possui metodologia descrita nos compêndios oficiais consultados e, por isso, os resultados da CLAE e UV d<sup>1</sup> estão sendo dispostos na forma de artigo para submissão a periódico concernente à área.

A dificuldade em obtenção de SQR de fármacos sob patente é uma realidade para laboratórios de pesquisa que trabalham com medicamentos novos. Por isso, a síntese de fármacos e produtos de degradação, identificação e determinação da pureza das matérias-primas devem ser encorajadas.

ACD LABS. **Software: ACD CRMN**, versão 2.51, 1997. Disponível em [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com).

ANTONOV, L.; NEDELTCHEVA, D. Resolution of overlapping UV-Vis absorption bands and quantitative analysis. **Chemistry Society Review**, v. 29, p. 217-227, 2000.

AVENTIS Pharmaceuticals. **Aventis receives FDA approval of an expanded indication in rheumatoid arthritis for ARAVA<sup>®</sup> (leflunomide) tablets**. 16 jun. 2003. Disponível em: [www.aventis-pharma.com](http://www.aventis-pharma.com).

BRANDL, M.; KENNEDY, J. A. Degradation of the antiarthritic prodrug, 3-carboxy-5-methyl-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-4-isoxazolecarboxamide, in aqueous solution. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n.2, p. 345-348, 1994.

BRASIL. Resolução – RDC nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 01 ago. 2005.

\_\_\_\_\_. Resolução – RE nº 210, de 04 de agosto de 2003. Regulamento técnico para as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos – 1/2003. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 14 ago. 2003 a.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - 2/2003. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 jun. 2003 b.

BERTOLINI, G. *et al.* A new rational hypothesis for the pharmacophore of the active metabolite of leflunomide, a potent immunosuppressive drug. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 40, No. 13, p. 2011-2016, 1997.

BURKE, S. **Regression and Calibration**. AMC Technical Briefs, LC-GC Europe Online Supplement, 1998. Versão eletrônica, disponível em [www.rsc.org](http://www.rsc.org).

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and practices. Third edition, revised and expanded**. Marcel Dekker: Nova York - Basel, 2000. ISBN 0-8247-0376-6.

CDER – Center of Drug Evaluation and Research. **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. US Food and Drug Administration, 1994.

CESCHEL, G. C.; BADIELLO, R.; RONCHI, C.; MAFFEI, P. Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 32, p. 1067-1072, 2003.

CHAN, V.; CHARLES, B. G.; TETT, S. E. Rapid determination of the active leflunomide metabolite A77 1726 in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 331–335, 2004.

DESOKY, E. S. Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis: na overview. **Current Therapeutic Research**. v. 62, n. 2, p. 92-112, 2001.

DIAS, V.C.; LUCIEN, J.; LeGATT, D.F.; YATSCOFF, R.W. Measurement of the active leflunomide metabolite (A77 1726) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Therapeutic Drug Monitoring**. v. 17, No. 1, p. 84-88, 1995.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: Na integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p. 755-767, 2001.

FABRE, H; EDDINE, N. H; BERGE, G. Degradation kinetics in aqueous solution of cefotaxime sodium, a third-generation cephalosporin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 73, n. 5, p. 611-8, 1984.

FOOD and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Approval Letter**. 10 set. 1998. Disponível em:  
[www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905\\_ARAVA\\_APPROV.PDF](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905_ARAVA_APPROV.PDF).

FOX, R.I. *et al*. Short analytical review – mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. **Clinical Immunology**. v. 93, n. 3, p. 198-208, 1999.

GOLDENBERG, M.M. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**. v. 21, No 11, p. 1837-1852, 1999.

GRAUL, A.; CASTANER, J. Leflunomide. **Drugs of the Future**. v. 23, n. 8, p. 827-837, 1998.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOECHST Marion Roussel Inc. **Pharmacology review**. [S.l.:s.n], 1998. Disponível em:  
[www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905\\_ARAVA\\_PHARMR\\_P1.PDF](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905_ARAVA_PHARMR_P1.PDF)

HOECHST Aklengesellschaft. US5,679,709, 21 out. 1994, 21 out. 2014.

HOECHST Alklengesellschaft. Kammerer; Friedrich-Johannes; Schleyerbach; Rudolf. **5-Methylisoxazole-4-carboxylic-(4-trifluoromethyl)-anilide**. US 4,284,786. 13 dez. 1979, 13 dez. 1999.

HSIEH, G. C. et al. Pharmacokinetics in rats of the immunosuppressive and antirheumatic drug leflunomide measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). **JOURNAL FASEB**. v. 9, n. 4, abstract 5495, 1995.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical methods: (definitions and terminology)**. Topic Q2A, 1994.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. **Validation on analytical procedures: Methodology**. Topic Q2B, 1996.

JACKMAN, L. M.; STERNHELL, S. **Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry**. Pergamon Press: London, v. 5, 1969.

JIMIDAR, M.; NIEMEIJER, N.; PEETERS, R.; HOOGMARTENS, J. Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets.

KIBBE, A. H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3. ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KLICK, S., *et al.* Toward a generic approach for Stress Testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, n. 2, p. 48-66, 2005.

KUO, E. A. et al. Synthesis, structure-activity relationship, and pharmacokinetics properties of dihydroorotate dehydrogenase inhibitors: 2-cyano-3-cyclopropyl-3-hydroxy-N-[3'-methyl-4'-(trifluoromethyl)phenyl]propenamide and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 39, p. 4608-4621, 1996.

LABCOMPLIANCE. **Method validation**, 2001. Disponível em: [www.labcompliance.com](http://www.labcompliance.com)

LAURINDO, I. M. M. et al. Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 42, n. 6, p. 355-361, 2002.

LEI, Y. X.; CERIONI, G.; RAPPOPORT, Z. Enols of Amides. The Effect of Fluorine Substituents in the Ester Groups of Dicarboalkoxyanilidomethanes on the Enol/Amide and *E*-Enol/*Z*-Enol Ratios. A Multinuclei NMR Study. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 8379-8394, 2001.



LI, J. et al. Pharmacokinetics of leflunomide in Chinese healthy volunteers. **Acta Pharmacol. Sin.** v. 23, n. 6, p. 551-555, 2002.

LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J. B. **Pharmaceutical dosage forms**. Marcel Dekker: New York, 2 ed., v. 1, 1989.

LIPSKI, P. E. **Rheumatoid arthritis**. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. International edition. 14 ed. 1998. CD-ROM.

McGREGOR, C.; SAUNDERS, M. H.; BUCKTON, G.; SAKLATVALA, R. D.. The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSCTM) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs. **Thermoquímica Acta**. v.417, p. 231-237, 2004.

PAPADOYANNIS, I. N.; GIKA, H. G. **Peak purity determination with diode array detector**. Encyclopedia of chromatography. ISBN 0-8247-4123-4. 2001.

PAPAGEORGIU, C.; ZURINI, M.; WEBER, H.; BORER, X. Leflunomide's bioactive metabolite has the minimal structural requirements for the efficient inhibition of human dihydroorotate dehydrogenase. **Bioorganic Chemistry**. v. 25, p. 233-238, 1997.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268 – 277, 1996.

REYNOLDS, D. W. *et al.* Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

ROWE, R. C.; SHESKEY P. J.; OWEN, S. C. **PHARMACEUTICAL Excipients**. Pharmaceutical Press:London, 2004. Versão eletrônica acessada no endereço eletrônico: [www.medicinescomplete.com](http://www.medicinescomplete.com) em fevereiro de 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. C. Validação em métodos cromatográficos e eletrofóreticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUCKEMANN, K. *et al.* Leflunomide inhibits pyrimidine *de novo* synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 34, p. 21682-21691, 1998.

SCHMIDT, A. et al. Simultaneous determination of leflunomide and its active metabolite, A77 1726, in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**. v. 17, n. 4, p. 276-281, 2003. (Abstract).

SCUTELLARI, P. N.; ORZINCOLO, C. Rheumatoid arthritis: sequences. **European Journal of Radiology**. v. 27, p. S31-S38, 1998.

SHABIR, G.A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopeia and the ICH. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

SHIMADZU SPD-10A Photodiode array detector, Instruction manual, 1996.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. Ed. Rio de Janeiro : LTC, 2000. p. 67.

STAHL, M. **Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology**. Agilent Technologies, 2003. Versão eletrônica acessada no endereço eletrônico: [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem) em julho de 2004.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2, n.3, p. 12-20, 1998.

TALSKY, G. **Derivative spectrophotometry: Low and High order**. Weinheim; Basel; Switzerland; Cambridge; New York, NY; Tokyo: VCH, 1994.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 494 – 511, 1997.

THE MERCK INDEX. Whitehouse station: New Jersey, 2000. Versão em CD.

THE UNITED State Pharmacopeia. 26 ed. Rockville: United State Pharmacopeial Convention, 2005. CD-ROM.

USHIPAR. ARAVA<sup>®</sup> tablets (leflunomide). Compiègne : s.n., 1998. Disponível em: [www.fda.gov](http://www.fda.gov).

VAN ROON, E. N.; RAEMAEEKERS, Y. J.; JANSEN, T.; VAN WANROOY, M.; BROUWERS, J. A rapid and simple determination of A77 1726 in human serum by high-performance liquid chromatography and its application for optimization of leflunomide therapy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 17–22, 2004.

VISCONTI, M; CITERIO, L; BORSA, M; PIFFERI, G. Degradative behavior of cadralazine in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 73, n. 12, p. 1812-5, 1984.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Churchill Livingstone: Londres, 1999. ISBN 0 443 05986 1.

ZHANG, K. E.; HEE, B.; LEE, C. A.; LIANG, B.; POTT, B. C. M. Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-nmr characterization of in vitro metabolites of a potent and irreversible peptidomimetic inhibitor of rhinovirus 3c protease. **Drug Metabolism And Disposition**, v. 29, n. 5, p. 729 – 735, 2001.

ZHANG, Q. *et al.* Application of LC/MS/MS in the quantification of SU101 and SU0020 uptake by 3T3/PDGFr cells. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p. 701-709, 2002.

---

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---