

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PRISCILA ABURACHID CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUIRAIS PARA
QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA CLOROQUINA EM
COMPRIMIDOS E EM PLASMA HUMANO**

**Belo Horizonte, MG
2017**

PRISCILA ABURACHID CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS QUIRAIS PARA
QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA CLOROQUINA EM
COMPRIMIDOS E EM PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César
Co-Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

**Belo Horizonte, MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradeço á minha família, meus pais, Marcus e Márcia, por me darem o suporte necessário para prosseguir. Ás minhas avós, meus tios e tias, primos e primas, a todos os familiares, pelo incentivo recebido.

Á minha orientadora, professora Dr. Isabela Cesar, por todo o apoio, paciência, disponibilidade, dedicação, aprendizado e confiança. Pelo constante incentivo ao meu crescimento pessoal e intelectual e, por todos os ensinamentos.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Gerson Pianetti, pela confiança, compreensão e pelo apoio oferecido durante a realização deste trabalho e aos professores Dr. Christian Fernandes e Dra. Cristina Soares, pelas conversas, sugestões e compreensão.

Á minha amiga Ana Carolina Ribeiro, pelo incentivo, conversas, desabafos e aprendizados.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e do CEDAFAR, especialmente, Luciano, Juliana Brêtas, Juliana Veloso, Mateus, Pedro, Naialy e Diego, pela ajuda, paciência, conversas, momentos de descontração e pelo agradável convívio e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

Aos amigos do Pharmascience Leonardo, Kelen, Flávia Silva, Flávia Alves, Andréia, Marina Vasconcelos e Raquel pelos ensinamentos, paciência, amizade e colaboração.

Aos amigos e professores da Universidade de Canberra e ICF, pela disponibilidade, participação e colaboração.

Ao Laboratório Químico Farmacêutico do Exército e Farmanguinhos pela doação dos comprimidos de difosfato de cloroquina.

“Se você pensa que pode ou sonha que pode, comece.

Ousadia têm genialidade, poder e magia.

Ouse fazer e o poder lhe será dado.”

Johann Goethe

“A persistência é o melhor caminho para o êxito.”

Charlis Chaplin

RESUMO

A malária é uma doença com alto potencial epidêmico, representando grave problema de saúde pública no mundo. No Brasil, a cloroquina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de casos de malária causada por *Plasmodium vivax*. Portanto, é essencial que os medicamentos contendo este fármaco apresentem qualidade, segurança e eficácia. A cloroquina, assim como vários outros antimaláricos, é quiral e demonstra enantioseletivas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas em humanos e animais, contudo, estes medicamentos são administrados como racematos. O conhecimento dos aspectos estereoseletivos destes agentes pode ser útil para melhor compreender os seus mecanismos de ação e, possivelmente, otimizar a sua segurança e /ou eficácia clínica. Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método analítico quiral, utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) para quantificação dos enantiômeros da cloroquina. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna cromatográfica Chirobiotic V® (100 x 2,1 mm, 5 µm) mantida a 25 °C, fase móvel contendo metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 µL e detecção a 258 nm. Na validação foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez, segundo a legislação vigente. Além disso, em parceria com a Universidade de Canberra, foi avaliada a enantioseparação da cloroquina por CLAE-UV, utilizando a coluna cromatográfica Chiralpak ID em diferentes composições de fase móvel. Posteriormente, em parceria com o Instituto de Ciências Farmacêuticas, foi desenvolvido o método bioanalítico utilizando CLAE acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), a fim de futuramente realizar a monitorização terapêutica dos enantiômeros de cloroquina em plasma humano. Os métodos analíticos quirais desenvolvidos permitiram a separação e quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos atualmente utilizados no país.

Palavras-chave: antimaláricos, cloroquina, cromatografia quiral, enantioseparação.

ABSTRACT

Malaria is a disease with high epidemic potential, representing a serious public health problem in the world. In Brazil, chloroquine is the drug of first choice for the treatment of malaria caused by *Plasmodium vivax*. Therefore, it is essential that drugs containing chloroquine have quality, safety and efficacy. Chloroquine, as well as several other antimalarials, is chiral and demonstrates enantioselective pharmacodynamic and pharmacokinetic properties in humans and animals, however, these drugs are administered as racemates. The knowledge of stereoselective aspects of these agents may be useful to better understand their mechanisms of action and to optimize their safety and/or clinical efficacy. In this study, a chiral analytical method for the quantification of chloroquine enantiomers, was developed using high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV). The chromatographic conditions were: chromatographic column Chirobiotic V® (100 x 2.1 mm, 5 µm) maintained at 25 ° C, mobile phase containing methanol: acetic acid: triethylamine (100: 0,12: 0,12), flow of 1 mL / min, injection volume of 10 µL and detection at 258 nm. The validation parameters evaluated according to the current legislation were: selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, and robustness. Additionally, in a partnership with Canberra University, the enantioseparation of chloroquine by HPLC-UV, using a stationary phase Chiralpak ID and different composition of mobile phases was evaluated. Later, in a partnership with the Institute of Pharmaceutical Sciences, the bioanalytical method was developed by HPLC coupled to sequential mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in order to carry out the therapeutic monitoring of chloroquine enantiomers in human plasma in the future. The chiral analytical methods developed allowed the separation and quantification of chloroquine enantiomers in tablets available commercially in Brazil.

Key words: antimalarials, chloroquine, chiral chromatography, enantioseparation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem da população sob o risco de contrair malária nos diferentes países do mundo.....	18
Figura 2: Ciclo biológico da malária.	22
Figura 3: Estrutura molecular da cloroquina.....	31
Figura 4: Enantiômeros da cloroquina.....	33
Figura 5: Subdivisão dos isômeros.	35
Figura 6: Representação esquemática de dois enantiômeros e dois diastereoisômeros.	36
Figura 7: Imagem especular da mão direita e esquerda.	36
Figura 8: Complexos diastereoisoméricos formados pela interação entre um receptor quiral e um par de enantiômeros.....	39
Figura 9: Princípio da resolução quiral baseada na teoria dos 3 pontos.	42
Figura 10: Estruturas químicas propostas para os glicopeptídeos macrocíclicos teicoplanina, teicoplanina aglicona, ristocetina A e vancomicina. Legenda: A-D demonstram as cavidades de inclusão; grupo R na teicoplanina corresponde, geralmente, ao ácido metil-decanóico.....	46
Figura 11: Principais sítios de interação de fase quiral contendo vancomicina.....	48
Figura 12: Possíveis sítios de interação hidrofóbica das FEQ contendo glicopeptídeos macrocíclicos (parte escura na figura).	50
Figura 13: Estrutura química e conformacional da Celulose (a) e Amilose (b).....	52
Figura 14: Estrutura química do polímero de triacetato de celulose.....	53
Figura 15: Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de amilose e celulose produzidas pela DAICEL Chem. Ind.....	54
Figura 16: Possíveis interações das FEQs derivadas de carbamatos com analitos quirais.....	55
Figura 17: Fórmula estrutural das colunas cromatográficas Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC, Chiralpak ID.	56
Figura 18: Cromatograma referente à análise realizada com a coluna Chirobiotic V e fase móvel contendo MeOH: AA: TEA na proporção 100: 0,10: 0,8.	81

Figura 19: Cromatograma referente aos enantiômeros do difosfato de cloroquina obtido com a fase móvel contendo metanol: ácido acético e trietilamina na proporção 100:0,12:0,12, em um fluxo de 1 mL/min e 25 °C.	90
Figura 20: Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido em DAD da solução de difosfato de cloroquina na concentração 60 µL/mL em fase móvel metanol: ácido acético e trietilamina (100:0,12:0,12).	91
Figura 21: Cromatograma obtido após a oxidação do difosfato de cloroquina nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.	93
Figura 22: Cromatograma obtido após a hidrólise básica de difosfato de cloroquina nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.	94
Figura 23: Curva analítica para avaliação da linearidade do método para o enantiômero 1 do difosfato de cloroquina na faixa de 24 a 36 µg/mL.	99
Figura 24: Curva analítica para avaliação da linearidade do método para o enantiômero 2 do difosfato de cloroquina na faixa de 24 a 36 µg/mL.	99
Figura 25: Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do enantiômero 1 difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.	100
Figura 26: Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.	100
Figura 27: Espectros ESI(+) – MS da cloroquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 320,224 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 247,2.	121
Figura 28: Espectros ESI(+) – MS da amodiaquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 356,164 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 283,2.	121
Figura 29: Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM, no modo ESI(+), para quantificação de cloroquina, utilizando-se coluna Chirobiotic V e fase móvel composta por metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo da fase móvel 1,0 mL/min, temperatura da coluna 25°C.	123
Figura 30: Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM, no modo ESI(+), para quantificação de cloroquina, utilizando-se coluna Chirobiotic V e fase móvel composta	

por metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo da fase móvel 1,1 mL/min,
temperatura da coluna 30 °C. 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fármacos antimaláricos.....	27
Tabela 2: Tratamento das infecções pelo <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto).....	28
Tabela 3: Tratamento das infecções pelo <i>P. vivax</i> , ou <i>P. ovale</i> com cloroquina em 3 dias e primaquina em 14 dias (esquema longo).....	28
Tabela 4: Tratamento das infecções pelo <i>P. malariae</i> para todas as idades e das infecções por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> em gestantes e crianças com menos de 6 meses com cloroquina em 3 dias.	29
Tabela 5: Esquema recomendado para prevenção das recaídas frequentes por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> com cloroquina semanal em 12 semanas.	29
Tabela 6: Seletores quirais e principais interações com analitos quirais.	41
Tabela 7: Componentes estruturais dos seletores quirais glicopeptídeos macrocíclicos disponíveis comercialmente	47
Tabela 8: Relação entre a FEQ, modo de interação e o tipo de composto a ser analisado. A marcação dupla significa que a seleção é preferível.	62
Tabela 9: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo polar iônico utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V.....	63
Tabela 10: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo reverso utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V.....	64
Tabela 11: Excipientes utilizados no preparo do placebo.....	66
Tabela 12: Preparo das soluções padrão de difosfato de cloroquina para avaliação da linearidade do método analítico.....	70
Tabela 13: Massas pesadas de difosfato de cloroquina IFA e placebo para solução estoque.	72
Tabela 14: Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de difosfato de cloroquina.	74
Tabela 15: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo normal e reverso utilizando a coluna cromatográfica Chiralpak ID.	76

Tabela 16: Valores dos pesos médios e variação em relação à média obtidos para cada lote analisado.	79
Tabela 17: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros de difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e trietilamina (TEA).	81
Tabela 18: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros de difosfato de cloroquina em fase móvel contendo metanol: acetonitrila: ácido acético: trietilamina (90:10: 0,15:0,05) na coluna Chirobiotic V.	83
Tabela 19: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e dietilamina (DA).	84
Tabela 20: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e hidróxido de amônio.	84
Tabela 21: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol e formiato de amônio (FA).	85
Tabela 22: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol e tampão acetato de amônio 20 mM (pH 5,0).	86
Tabela 23: Parâmetros cromatográficos obtidos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e trietilamina (TEA).	88
Tabela 24: Condições analíticas estabelecidas para determinação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina em comprimidos por CLAE-UV.	91
Tabela 25: Resultados encontrados após as amostras de difosfato de cloroquina serem submetidas a condições de estresse.	92
Tabela 26: Concentrações do enantiômero 1 do difosfato de cloroquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.	95

Tabela 27: Concentrações do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.....	96
Tabela 28: Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO referente ao enantiômero 1 do difosfato de cloroquina.	97
Tabela 29: Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO referente ao enantiômero 2 do difosfato de cloroquina.	98
Tabela 30: Valores de área e teor do enantiômero 1 do difosfato de cloroquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.	102
Tabela 31: Valores de área e teor do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.	102
Tabela 32: Valores de recuperação obtidos para enantiômeros 1 e 2 do difosfato de cloroquina.....	103
Tabela 33: Resultados da influência dos efeitos no teor e tempo de retenção dos enantiômeros do difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da robustez por CLAE.....	104
Tabela 34: Resultados médios da determinação de teor dos enantiômeros do difosfato de cloroquina nas amostras de comprimidos.	105
Tabela 35: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina no modo reverso, na coluna Chiralpak ID.	107
Tabela 36: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina no modo normal, na coluna Chiralpak ID.....	114
Tabela 37: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina na coluna Chirobiotic V e Chiralpak ID.	119
Tabela 38: Íons monitorados e condições de operação do MS-MS.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

[α]	rotação específica
A	Desvio no plano da luz polarizada (graus)
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
>	Maior que
\leq	Menor ou igual a
\geq	Maior ou igual a
λ	Comprimento de onda
a	Coefficiente linear
AA	Ácido Acético
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Coefficiente angular
CLAE	Cromatografia a Líquido de alta eficiência
CQ	Cloroquina
d	Estatística de Durbin-Watson
DA	Dietilamina
DAD	Detector de arranjo de diodos
dL	Limite crítico inferior de Durbin-Watson
DPa	Desvio padrão do intercepto
DPR	Desvio padrão relativo
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
ESI+	Electrospray no modo positivo
eV	Elétron volt
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico hexa-hidratado
FEQ	Fase estacionária quiral

FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	fase reversa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H ₀	Hipótese nula
ICH	International Conference on Harmonization; Conferência Internacional de Harmonização
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Jej	Resíduo padronizado de Jacknife
k	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LQFEx	Laboratório Químico Farmacêutico do Exército
m/z	Relação massa/carga
mAU	Miliabsorbância
MeOH	Metanol
min.	Minuto
µg	Micrograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MTBE	Éter metil terc-butílico
N	Número de pratos teóricos
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ HCO ₂	Formiato de amônio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde

p	Nível de significância
PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	polar-iônico
PI	Padrão interno
PO	Polar-orgânica
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Coeficiente de correlação de Ryan-Joiner
R2	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
Rs	Resolução entre os picos
S	Simetria
SQR	Substância química de referência
<i>t</i>	t de student
TEA	Trietilamina
temp.	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
<i>t</i> ₀	Tempo morto
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization; Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Características gerais da malária	21
2.2	Modo de transmissão e ciclo biológico do parasita	21
2.3	Manifestações clínicas	23
2.4	Diagnóstico	24
2.5	Tratamento e Terapêutica	25
2.6	Eficácia e resistência aos antimaláricos	30
2.7	Cloroquina	31
2.8	Quiralidade e separação enantiomérica de cloroquina	32
2.9	Isomerismo e quiralidade	34
2.10	Importância da enantiometria	37
2.11	Discriminação quiral	40
2.12	Fases estacionárias quirais e mecanismos de enantioseparação	41
2.13	Fases estacionárias quirais a base de glicopeptídeos macrocíclicos	44
2.13.1	Características estruturais e mecanismos de reconhecimento quiral	44
2.13.2	Modos de interação	49
2.13.2.1	Fase Reversa	49
2.13.2.2	Fase polar iônica	50

2.13.2.3 Fase normal	51
2.13.2.4 Fase polar orgânica	51
2.14 Fases estacionárias quirais a base de polissacarídeos	52
2.14.1 Características estruturais e mecanismos de reconhecimento quiral	52
3 OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos Específicos	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 Materiais	59
4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR), IFA e comprimidos	59
4.1.2 Reagentes e Vidraria	59
4.1.3 Equipamentos	60
4.2 Métodos	61
4.2.1 Análise do difosfato de cloroquina IFA por polarimetria	61
4.2.2 Determinação de peso dos comprimidos	61
4.2.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos	61
4.2.4 Validação do método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido	64
4.2.5 Quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos	74
4.2.6 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina utilizando coluna tipo polissacarídeos	75
4.2.7 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em plasma utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos	76

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1	Análise do difosfato de cloroquina IFA por Polarimetria	78
5.2	Determinação do peso médio dos comprimidos contendo cloroquina	79
5.3	Desenvolvimento de método analítico para quantificação e identificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido	79
5.4	Validação do método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos	92
5.5	Quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos.....	105
5.6	Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina utilizando coluna tipo polissacarídeos.....	106
5.7	Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em plasma utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos	120
6	CONCLUSÃO	126
7	REFERENCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

A malária representa grave problema de saúde pública no mundo, cujos agentes etiológicos são protozoários transmitidos por vetores. Ela é transmitida em 106 países, especialmente da Ásia, África e Américas Central e do Sul. Nesses países, há um total de 3 bilhões de pessoas sob o risco de contrair essa infecção. A **Figura 1** mostra a porcentagem da população em cada país sob o risco de contrair malária. Observa-se que, no Brasil, até 20% da população apresenta esse risco (WHOa, 2015).

Figura 1: Porcentagem da população sob o risco de contrair malária nos diferentes países do mundo.



Fonte: Adaptado de WHOa, 2015.

Em 2015, aproximadamente 212 milhões de casos de malária ocorreram no mundo. Cerca de 143 mil destes casos ocorreram no Brasil, concentrados em seis estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima (WHO, 2016; BRASIL, 2014).

O Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), tem como objetivo diminuir a letalidade e a gravidade dos casos, reduzir a incidência da doença, eliminar a transmissão em áreas urbanas e manter a ausência da doença em locais onde a transmissão já foi interrompida. O programa utiliza várias estratégias para atingir os seus objetivos, dentre elas o diagnóstico precoce e o tratamento oportuno e

adequado dos casos e medidas específicas de controle do mosquito transmissor (BRASIL 2010; BRASIL, 2003a.).

A quimioterapia é imprescindível no tratamento dos pacientes com diagnóstico da malária, pois interrompe o ciclo de vida do parasita, impedindo as manifestações clínicas da infecção. Vários medicamentos são utilizados no tratamento das diferentes formas de malária em humanos, visando atingir o parasita em pontos-chaves do seu ciclo evolutivo. No Brasil, são disponibilizados quinina, doxiciclina, mefloquina, lumefantrina, derivados da artemisinina, cloroquina e primaquina, entre outros (WHO, 2015; BRASIL, 2003a.).

Para que estes medicamentos apresentem eficácia, é importante o controle de qualidade dos medicamentos, a monitorização terapêutica e o acompanhamento dos seus efeitos adversos. Durante as décadas de 1980 e 1990, o problema da resistência do agente etiológico a alguns fármacos se intensificou causando problemas no controle da doença, destacando-se a resistência de *Plasmodium falciparum* à cloroquina e a outros antimaláricos. Entre os fatores envolvidos no surgimento de resistência, encontra-se o tratamento inadequado e esquemas terapêuticos de difícil adesão (BRASIL, 2010; WHO, 2010).

A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos antimaláricos é um dos principais obstáculos na luta contra a doença, dificultando o desenvolvimento de esquemas terapêuticos eficazes, aumentando o custo global do controle da doença, e promovendo o desenvolvimento de epidemias. Apesar do histórico da resistência da malária a cloroquina, este medicamento ainda é utilizado como tratamento de primeira escolha em vários países, principalmente para o tratamento de malária causada por *Plasmodium vivax* (WHO, 2010).

As características farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos fármacos são determinantes importantes da resistência. Fármacos com longa meia-vida de eliminação podem exercer seleção residual em infecções novas contraídas após o tratamento da infecção primária, quando o fármaco persiste em concentrações subterapêuticas no plasma. A manutenção de concentrações adequadas do fármaco

por um tempo longo é necessária para a completa eliminação do parasita (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Entretanto, nem todas as falhas observadas no tratamento da malária se devem ao desenvolvimento de resistência. Fatores críticos devem ser avaliados quando há falha terapêutica, como a verificação da qualidade e do prazo de validade do medicamento. Deste modo, a monitorização terapêutica dos fármacos constitui uma ferramenta importante para avaliação das concentrações plasmáticas dos antimaláricos utilizados, tornando possível avaliar o desenvolvimento de resistência, assim como a eficácia do tratamento (SHANKS, 2006).

A maioria dos fármacos atualmente utilizados no tratamento e profilaxia de malária é quiral e demonstra propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas enantioseletivas em seres humanos e animais. Contudo, estes medicamentos ainda são administrados como racematos. Deste modo, a avaliação da disposição destes enantiômeros no organismo utilizando métodos viáveis e exequíveis é necessária para melhorar a terapia da doença. O conhecimento dos aspectos estereoseletivos destes agentes pode ser útil para melhor compreender os seus mecanismos de ação e, conseqüentemente a sua segurança e eficácia clínica (BROCKS; MEHVAR, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais da malária

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa febril aguda, cujos agentes etiológicos são protozoários transmitidos por vetores. No Brasil, a magnitude da malária está relacionada à elevada incidência da doença na região amazônica e a sua potencial gravidade clínica, causando consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco, principalmente naquela que vive em condições precárias de habitação e saneamento (BRASIL, 2014).

Cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil, há três espécies associadas a malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. O *P. ovale* está restrito a determinadas regiões do continente africano e a casos importados de malária no Brasil. O *P. knowlesi* é um parasita de macacos, o qual tem ocorrido registros em casos humanos no Sudeste Asiático (BRASIL, 2014).

Os vetores são mosquitos pertencentes à ordem Díptera, gênero *Anopheles*. Este gênero compreende aproximadamente 400 espécies, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil e 11 delas tem importância epidemiológica na transmissão da doença. A espécie *darlingi* é o principal vetor de malária no Brasil (BRASIL, 2014).

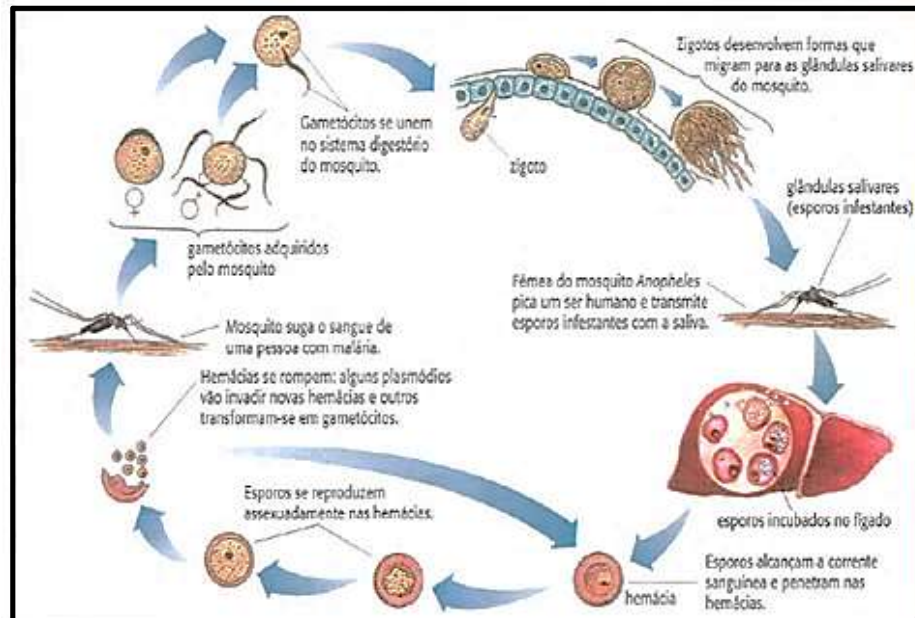
2.2 Modo de transmissão e ciclo biológico do parasita

O principal modo de transmissão da malária ao homem se dá quando fêmeas de mosquitos anofelinos, contendo em suas glândulas salivares com *Plasmodium* na forma de esporozoítos, inoculam estes parasitos durante o repasto sanguíneo. As fontes de infecção humana para os mosquitos são pessoas doentes ou mesmo indivíduos assintomáticos, que albergam formas sexuadas do parasito. A infecção natural do homem com espécies de plasmódios simianos é pouco relatada (NEVES *et al.*, 2005).

Apesar de infrequente, a infecção malárica pode ser transmitida acidentalmente, como resultado de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas e acidentes em laboratório. A infecção congênita tem sido também raramente descrita. Nestes casos, o ciclo exo-eritrocítico não é observado (NEVES *et al.*, 2005).

A **Figura 2** evidencia o ciclo contínuo de desenvolvimento da malária, delineando as etapas que ocorrem no hospedeiro vertebrado e hospedeiro invertebrado.

Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.



Fonte: PAULINO, 2004; JOTTA, 2009.

A infecção inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados nos humanos pelo inseto vetor. Durante um repasto sanguíneo infectante, aproximadamente 15 a 200 esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, permanecendo ali por cerca de 15 minutos antes de alcançarem a corrente sanguínea. Os esporozoítos de *Plasmodium* podem entrar em células hospedeiras sem nelas se desenvolverem. Isto propicia a sua migração por diferentes células, antes que ocorra a infecção de um hepatócito. Entretanto, somente no hepatócito se processa o desenvolvimento parasitário (NEVES *et al.*, 2005).

Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos. Alguns dos merozoítos serão fagocitados e outros irão migrar para corrente sanguínea a fim de invadir os eritrócitos. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular e, portanto, precede o ciclo sanguíneo do parasito (NEVES *et al.*, 2005).

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula populações geneticamente distintas de esporozoítos: algumas se desenvolvem rapidamente, enquanto outras ficam em estado de latência no hepatócito, sendo por isso denominadas hipnozoítos. Estes hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas tardias da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, em geral dentro de seis meses para a maioria das cepas de *P. vivax*. As recaídas são, portanto, ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos consequentes da esquizogonia tardia (NEVES *et al.*, 2005; BRASIL, 2001).

O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com consequente formação de merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos (NEVES *et al.*, 2005).

2.3 Manifestações clínicas

O quadro clínico típico da malária é caracterizado por febre precedida de calafrios, seguida de sudorese profusa, fraqueza e cefaleia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de plasmódio infectante. Em alguns pacientes, aparecem sintomas prodromicos, vários dias antes dos paroxismos da doença, a exemplo de náuseas, vômitos, astenia, fadiga e anorexia. Baço e fígado podem estar aumentados e dolorosos a palpação (REY, 2001).

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, na dependência da espécie do parasita, da quantidade de parasitas circulantes, do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente. As gestantes e as crianças estão sujeitas a maior gravidade, principalmente por infecções pelo *P. falciparum*, que podem ser letais. Pela inespecificidade dos sinais e sintomas provocados pelo *Plasmodium*, o diagnóstico clínico da malária não é preciso, pois outras doenças febris agudas podem apresentar sinais e sintomas semelhantes, tais como a dengue, a febre amarela, a leptospirose, a febre tifoide e muitas outras. Dessa forma, a tomada de decisão de tratar um paciente por malária deve ser baseada na confirmação laboratorial da doença (BRASIL, 2010; NEVES *et al.*, 2005).

Adultos não imunes, bem como crianças e gestantes, podem apresentar manifestações mais graves da infecção, podendo ser fatal no caso de *P. falciparum* que, em geral, é função da parasitemia. Considera-se hiperparasitemia quando estão mais de 2% das hemácias parasitadas no primoinfectado e mais de 5% das hemácias parasitadas naqueles indivíduos que já tiveram várias malárias no passado (NEVES *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico de malária grave, algumas características clínicas devem ser observadas atentamente, como prostração, alteração da consciência, dispneia ou hiperventilação, convulsões, hipotensão arterial ou choque, edema pulmonar, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, hiperpirexia (>41 °C) e oligúria. Se presentes, o paciente deve ser conduzido de acordo com as orientações para tratamento da malária grave (BRASIL, 2014).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico correto da infecção malárica somente é possível pela demonstração do parasito ou de antígenos relacionados no sangue periférico do paciente. São utilizados os seguintes métodos diagnósticos: gota espessa, esfregaço delgado, testes rápidos para detecção de componentes antigênicos de plasmódio e diagnóstico por técnicas moleculares (WHOa, 2015; BRASIL, 2014).

O método mais utilizado é o da microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de Walker. Esta técnica baseia-se na visualização do parasito por meio de microscopia óptica, após coloração com corante vital (azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitos, a partir da análise da sua morfologia e dos seus estágios de desenvolvimento (WHOa, 2015).

O método por esfregaço delgado possui baixa sensibilidade, porém, este permite, com mais facilidade, a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise de sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado (BRASIL, 2014).

Os testes imunocromatográficos são testes rápidos para a detecção de componentes antigênicos de plasmódio. São realizados em fitas de nitrocelulose contendo anticorpo monoclonal contra antígenos específicos do parasito. Em parasitemia superior a 100 parasitos/ μ L, podem apresentar sensibilidade de 95% ou mais quando comparados à gota espessa. Grande parte dos testes hoje disponíveis discrimina especificamente o *P. falciparum* das demais espécies. Por sua praticidade e facilidade de realização, estes testes são úteis para a confirmação diagnóstica, contudo não avaliam a densidade parasitaria nem a presença de outros hemoparasitos (BRASIL, 2014; NEVES *et al.*, 2005).

As técnicas moleculares mais utilizadas para o diagnóstico da malária são o Nested PCR (reação da polimerase em cadeia) ou PCR convencional e o PCR em tempo real. O custo elevado, a dificuldade em sua interpretação, a falta de infraestrutura e a falta de mão de obra especializada, restringem o uso dessas técnicas aos laboratórios de referência (BRASIL, 2014).

2.5 Tratamento e Terapêutica

O tratamento da malária visa a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítas) da espécie *P. vivax*, evitando

assim as recaídas. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas deve visar também a redução de fontes de infecção, pelo uso de medicamentos que eliminam as formas sexuadas dos parasitos (WHOa, 2015; BRASIL, 2001).

A decisão de como tratar o paciente com malária deve ser precedida de várias informações, como: espécie de plasmódio infectante; especificidade dos esquemas terapêuticos a serem utilizados; idade do paciente, devido a maior toxicidade em crianças e idosos; história de exposição anterior à infecção; condições associadas, tais como gravidez e algumas comorbidades; gravidade da doença, pela necessidade de hospitalização; tratamento com esquemas especiais de antimaláricos (NEVES *et al.*, 2005; REY, 2001).

Durante o tratamento, é necessário acompanhar o paciente pois a cura clínica e mesmo o desaparecimento total dos parasitas do sangue não significa necessariamente uma cura parasitológica. Se não houver a eliminação dos hipnozoítos do *P. vivax* ou ainda se o paciente portar parasitas de malária causada por *P. falciparum* resistentes ao medicamento, poderá ocorrer o imprevisto de um novo episódio, sem que o paciente tenha voltado para área de transmissão. Nos casos de malária causada por *P. falciparum*, este acompanhamento deve ser semanal e pode variar de 28 a 42 dias, dependendo da meia-vida de eliminação do fármaco utilizado para o tratamento, e, no caso de malária causada por *P. vivax*, o acompanhamento deve ser mensal e se possível por 6 a 12 meses (NEVES *et al.*, 2005; BRASIL, 2001.).

Os antimaláricos podem ser classificados de acordo com suas características químicas, farmacológicas, seu local de ação no ciclo biológico do parasita, sua finalidade, seu modo de obtenção, entre outras. Entretanto, mais importante que o simples conhecimento classificatório dos antimaláricos é a necessidade de familiarização com as suas propriedades farmacocinéticas, eficácia, grau de tolerância e sua capacidade de induzir efeitos tóxicos. Em termos práticos, é muito útil a classificação dos fármacos antimaláricos segundo suas características químicas e segundo o local de ação no ciclo biológico do parasita.

A **Tabela 1** descreve os principais antimaláricos, informando a categoria química a qual pertencem e o mecanismo de ação (SWEETMAN, 2005).

Tabela 1: Principais fármacos antimaláricos.

Categoria química	Fármaco	Atividade
4-aminoquinolinas	Cloroquina	Esquizonticida sanguíneo de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal.
8-aminoquinolinas	Primaquina	Esquizonticidas teciduais. Apresentam atividade gametocitocida e agem em outras fases do ciclo de vida do parasita.
4-metanolquinolinas	Quinina Mefloquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida.
Lactona sesquiterpênica	Artesimina	Esquizonticidas sanguíneos.
Biguaninas	Proguanil	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta.
Diaminopirimidas	Pirimetamina	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta.
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo.

Fonte: SWEETMAN, 2005.

A cloroquina é um medicamento ainda bastante utilizado no tratamento da malária causada por *P. vivax*, pois o parasita permanece sensível ao medicamento em muitas partes do mundo. A cloroquina, geralmente, é bem tolerada, os efeitos adversos comuns incluem tontura, náusea, vômito, dor abdominal e prurido (WHO, 2015).

Conforme descrito no Guia prático de tratamento da malária no Brasil, a utilização da cloroquina é recomendada no tratamento da malária não complicada, demonstrado nos esquemas de tratamento indicados nas **Tabelas 2 a 5** (BRASIL, 2010).

Tabela 2: Tratamento das infecções pelo *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto).

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses, 5-9 kg	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3anos, 10-14 kg	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4-8 anos, 15-24kg	1	2	1	2	1	2	2
Idade/Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9-11 anos, 25-34 kg	2	1	2	1	2	1	1
12-14 anos, 35-49 kg	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15anos, ≥50 kg	4	2	3	2	3	2	2

- Cloroquina: comprimidos de 150 mg. Primaquina infantil: comprimidos de 5 mg e Primaquina adulto: comprimidos de 15mg.

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 3: Tratamento das infecções pelo *P. vivax*, ou *P. ovale* com cloroquina em 3 dias e primaquina em 14 dias (esquema longo).

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dia
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses, 5-9 kg	1/2	1/2	1/4	1/2	1/4	1/2	1/4
1-3anos, 10-14 kg	1	1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
4-8 anos, 15-24kg	1	1	1	1	1	1	1
Idade/Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9-11 anos, 25-34 kg	2	1/2	2	1/2	2	1/2	1/2
12-14 anos, 35-49 kg	3	1	2	1	2	1	1/2
≥ 15anos, ≥ 50 kg	4	1	3	1	3	1	1

- Cloroquina: comprimidos de 150 mg. Primaquina infantil: comprimidos de 5 mg e Primaquina adulto: comprimidos de 15mg.

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 4: Tratamento das infecções pelo *P. malariae* para todas as idades e das infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* em gestantes e crianças com menos de 6 meses com cloroquina em 3 dias.

Idade/Peso	Número de comprimidos por dia		
	1º dia	Cloroquina 2º dia	3º dia
<6 meses 1-4 kg	1/4	1/4	1/4
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1/4	1/4
1-3 anos 10-14 kg	1	1/2	1/2
4-8 anos 15-24 kg	1	1	1
9-11 anos 25-34 kg	2	2	2
12-14 anos 35-49 kg	3	2	2
≥ 15anos ≥ 50kg	4	3	3

- Cloroquina: comprimidos de 150 mg.

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 5: Esquema recomendado para prevenção das recaídas frequentes por *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina semanal em 12 semanas.

Idade/Peso	Número de comprimidos por semana Cloroquina
<6 meses 1-4 kg	1/4
6-11 meses 5-9 kg	1/4
1-3 anos 10-14 kg	1/2
4-8 anos 15-24 kg	3/4
9-11 anos 25-34 kg	1
12-14 anos 35-49 kg	1 e 1/2
≥ 15anos ≥ 50kg	2

- Cloroquina: comprimidos de 150 mg.

Fonte: BRASIL, 2010.

2.6 Eficácia e resistência aos antimaláricos

A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos antimaláricos é um dos principais obstáculos na luta contra a malária, sendo definida pela capacidade adquirida do parasita de sobreviver e/ou reproduzir-se, apesar da correta administração e da satisfatória absorção do fármaco na dose normalmente recomendada. A resistência ao antimalárico pode levar ao fracasso no tratamento, contudo nem todas as falhas do tratamento são causadas por resistência aos fármacos. O insucesso no tratamento também pode ser o resultado de administração de uma dosagem incorreta ao paciente, de problemas de adesão ao tratamento, má qualidade do medicamento, interações com outros fármacos, deficiência na absorção do fármaco, ou até erros de diagnóstico. Esses fatores também podem acelerar a disseminação da resistência aos antimaláricos pela exposição dos parasitas aos níveis inadequados de fármacos (WHO, 2010).

Os fármacos para a forma grave da doença (quinina e os derivados de artemisinina) são praticamente não afetados pela resistência até o momento, contudo os fármacos "de primeira linha", utilizados principalmente por pacientes ambulatoriais (por exemplo, cloroquina), então entre as principais causas de preocupação (WINSTANLEY, 2001).

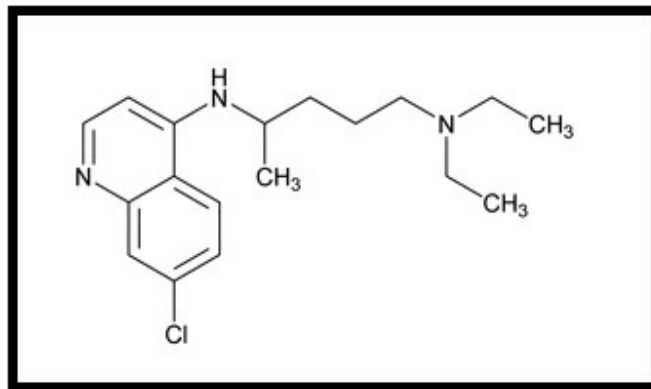
A cloroquina continua a ser o tratamento de escolha para *P. vivax* em várias áreas, onde este fármaco permanece eficaz. O insucesso do tratamento na profilaxia tem sido observado em países como Afeganistão, Brasil, Camboja, Colômbia, Guiana, Etiópia e Índia, entre outros. A confirmação da verdadeira resistência à cloroquina, no entanto, requer estudos adicionais das concentrações do fármaco no sangue (WHO, 2010).

O desenvolvimento de resistência pode decorrer devido à mutação genética do parasita, resultando em um mutante resistente, e subseqüente processo de seleção natural, no qual a vantagem da sobrevivência, na presença do fármaco, favorece a transmissão dos mutantes resistentes e, portanto, a propagação da resistência. A meia-vida de eliminação é um fator importante para avaliar a probabilidade de um antimalárico sofrer resistência. A cloroquina possui meia-vida longa, de semanas ou meses, desta forma apresenta um amplo período de tempo para a seleção de parasitas resistentes (WHO, 2010).

2.7 Cloroquina

A cloroquina (**Figura 3**) é uma 4-aminoquilonina com atividade esquizotocida para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Não tem ação contra as formas hepáticas. Além de seu efeito antimalárico, a cloroquina tem também ação antipirética e antiinflamatória. Poucas cepas de *P. falciparum* são ainda sensíveis à cloroquina (BRASIL, 2001).

Figura 3: Estrutura molecular da cloroquina.



Fonte: THE UNITED STATES, 2016.

O comprimido apresenta o fármaco na forma de difosfato de cloroquina. Este sal possui as seguintes características físico-químicas (THE UNITED STATES, 2016; THE MERCK, 2006.):

- CAS - [50-63-5].
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$.
- Descrição: cristais incolores de sabor amargo. Apresenta duas formas polimórficas.
- Ponto de fusão: uma forma polimórfica: 193 a 195 °C; outra forma: 215 a 218 °C.
- Solubilidade: facilmente solúvel em água, pouco solúvel em soluções neutras ou alcalinas. Praticamente insolúvel em etanol, benzeno, clorofórmio e éter etílico.
- Massa molar: 515,86 g/mol.

A cloroquina é rápida e quase completamente absorvida a partir do trato gastrointestinal, quando administrada por via oral, mas as concentrações plasmáticas máximas podem variar consideravelmente (KRISHNA, WHITE 2008; SWEETMAN,

2005; DUCHARME, FARINOTTI, 1996). Os níveis plasmáticos máximos são alcançados em cerca de 3 a 5 horas após a administração por via oral (HARDMAN, LIMBRID, 2003).

A absorção também é rápida após administração intramuscular ou subcutânea. É amplamente distribuída nos tecidos corporais e tem um grande volume de distribuição aparente. Ela se acumula em concentrações elevadas em alguns tecidos, tais como os rins, fígado, pulmões e baço. Liga-se fortemente a células contendo melanina tais como células dos olhos e da pele. Atravessa também a placenta (KRISHNA, WHITE 2008; SWEETMAN, 2005; DUCHARME, FARINOTTI, 1996).

A cloroquina é distribuída com relativa lentidão e em grande variedade de tecidos pelo corpo. Cerca de 60% da cloroquina se liga a proteínas do plasma. A eliminação é lenta, sendo em sua maioria por via renal, correspondendo à metade de sua depuração total sistêmica. Apresenta meia-vida de eliminação de 1 a 2 meses podendo persistir em tecidos durante meses ou mesmo anos depois a interrupção da terapia (WHO, 2010; HARDMAN, LIMBRID, 2003).

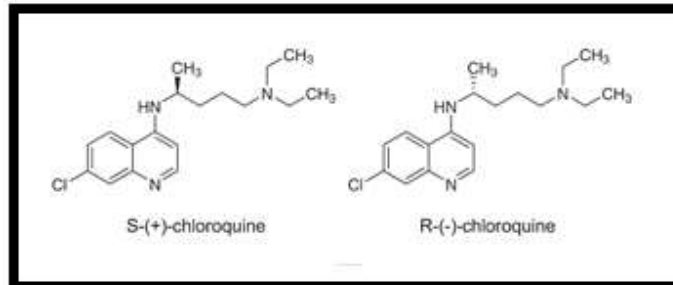
A cloroquina sofre biotransformação no fígado, pelo citocromo P450, formando principalmente monodesetilcloroquina (WHO, 2010; HARDMAN, LIMBRID, 2003.) e em menor quantidade a bisdesetilcloroquina. A cloroquina e os seus metabólitos são excretados na urina, com cerca de metade de uma dose aparecendo como fármaco inalterado e 10% como o metabólito monodesetilcloroquina (WHITE 2008; SWEETMAN, 2005; DUCHARME, FARINOTTI, 1996; KRISHNA).

2.8 Quiralidade e separação enantiomérica de cloroquina

Vários agentes antimaláricos são quirais e comercializados como racematos. Estes fármacos incluem cloroquina (**Figura 4**), hidroxicloroquina, quinacrina, primaquina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina e tafenoquina. Para alguns destes agentes (halofantrina, primaquina, cloroquina), a estereosseletividade pode ser observada na

capacidade dos enantiômeros provocar determinados efeitos adversos (BROCKS, MEHVAR, 2003).

Figura 4: Enantiômeros da cloroquina.



Fonte: WONGWAN *et al.*, 2011.

O estudo da atividade antimalárica dos dois enantiômeros da cloroquina realizado em ratos por Fink e colaboradores e Haberkorn e colaboradores em 1979, relatou que a (+)-cloroquina é mais ativa do que o outro isômero para o *P. falciparum*. A toxicidade foi menor para o enantiômero (+) neste modelo (FU *et al.*, 1986; WONGWAN *et al.*, 2011).

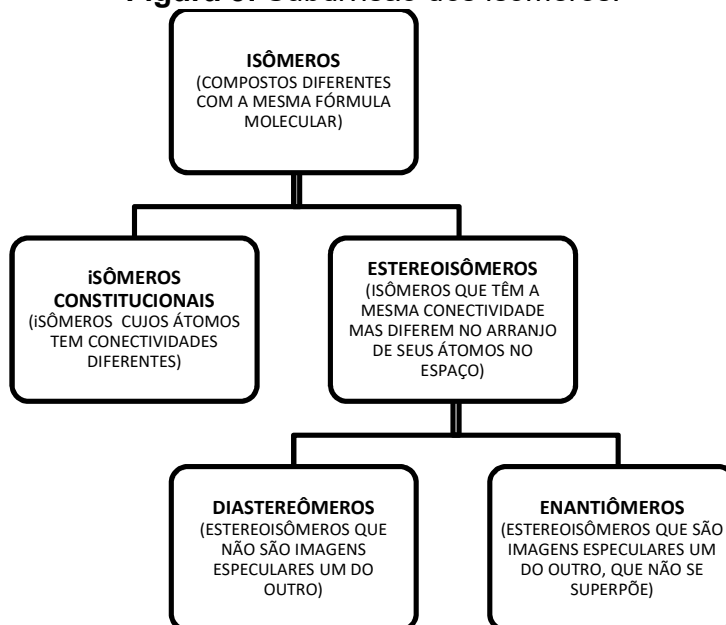
Propriedades farmacocinéticas estereoseletivas dos enantiômeros da cloroquina foram investigadas em humanos após uma dose oral única dos enantiômeros separados. O estudo foi realizado de acordo com um delineamento experimental cruzado com um período de *washout* entre a administração de cada enantiômero. A meia-vida terminal e o tempo médio de residência foram maiores para (R)-cloroquina (294 h e 388 h, respectivamente) do que para (S)-cloroquina (236 h e 272 h, respectivamente). O clearance corporal total foi menor para o enantiômero (R) do que para o (S). Embora o estereoisômero (R) tenha permanecido mais tempo no organismo, o seu volume de distribuição (3410 ± 720 L) foi inferior ao encontrado para o enantiômero (S) (4830 ± 1490 L). A ligação às proteínas plasmáticas foi diferente para ambos os estereoisômeros da cloroquina em relação à ligação preferencial à albumina humana e alfa 1-glicoproteína ácida. A ligação à proteína do plasma humano total foi de $66,6 \pm 3,3\%$ para (S)-cloroquina e $42,7 \pm 2,1\%$ para o enantiômero (R) (AUGUSTIJNS, VERBEKE, 1993).

A resolução dos enantiômeros de cloroquina e seu principal metabólito monodesetilcloroquina utilizando CLAE foi primeiramente descrita por Ofori-Adjei e colaboradores em 1983, que utilizaram uma coluna contendo alfa 1-glicoproteína ácida e detecção por fluorescência. No entanto, o método desenvolvido foi incapaz de separar o fármaco do metabólito em uma única corrida, exigindo uma etapa anterior para isolar estes compostos, utilizando uma coluna de sílica de fase aquiral. A separação dos enantiômeros de cloroquina nesta coluna foi também realizada por Ibrahim e colaboradores em 1984, que verificaram a influência de diferentes parâmetros na retenção e resolução dos analitos (MAGALHÃES, BONATO, 2010).

Okamoto e colaboradores, em 1986, utilizaram uma coluna contendo um derivado fenilcarbamato da amilose no modo normal para a discriminação dos enantiômeros de cloroquina. Posteriormente Safni e colaboradores obtiveram a enantioseparação da Cloroquina utilizando uma coluna cromatográfica contendo heparina ligada eletrostaticamente em substituintes aniônicos como seletores quirais. Recentemente, a separação destes enantiômeros foi alcançada em uma coluna de vancomicina no modo invertido de eluição (DESAI, ARMSTRONG, 2004). Os autores também observaram que o aditivo trifluoroacetato de amônio melhorou a intensidade do sinal dos analitos fornecida pelo espectrômetro de massas no modo de ionização *electrospray* positivo. (MAGALHÃES, BONATO, 2008; MAGALHÃES, BONATO, 2010).

2.9 Isomerismo e quiralidade

Berzelius propôs em 1823 que substâncias de mesma composição e com diferentes propriedades fossem denominadas isoméricas, nascendo assim o conceito de isomerismo. O isomerismo pode ser dividido em duas formas básicas: isomerismo estrutural e estereoisomerismo (QUEIROZ, BATISTA, 1998). A subdivisão dos isômeros está esquematizada na **Figura 5** (SOLOMONS, 2000).

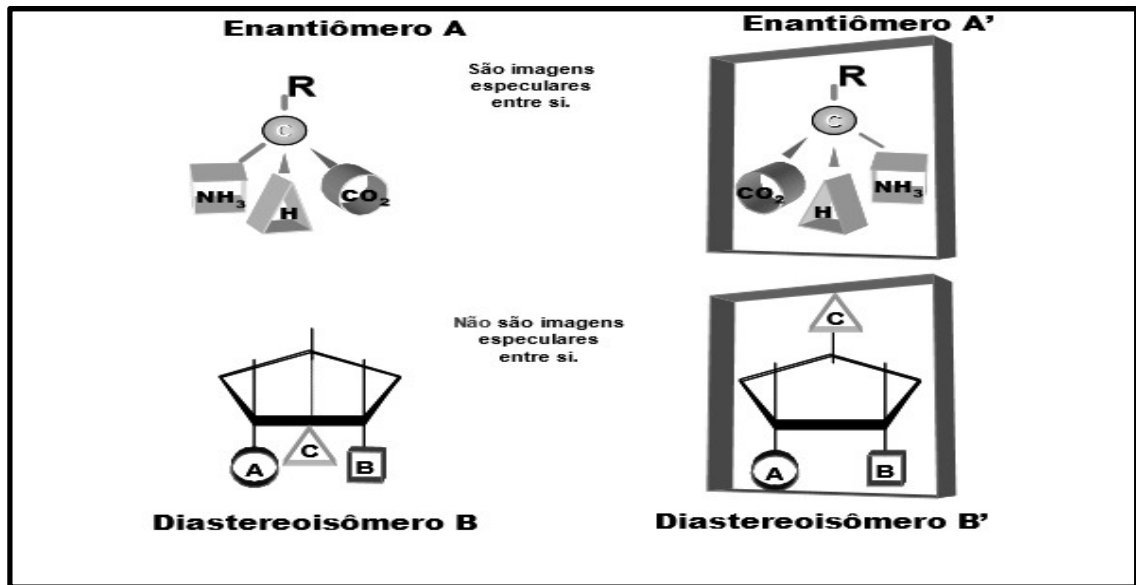
Figura 5: Subdivisão dos isômeros.

Fonte: SOLOMONS, 2000.

Isômero estrutural, também chamado de constitucional ou de posição, ocorre quando duas ou mais moléculas tem a mesma fórmula empírica, mas os seus constituintes são arranjados diferentemente, ou seja, os átomos estão conectados em uma ordem distinta (QUEIROZ, BATISTA, 1998).

Esteroisômeros são aqueles isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem uma distribuição espacial diferente na molécula. Eles podem ser divididos em geométricos ou ópticos. Os isômeros geométricos, comumente chamado de diastereoisômeros, são estereoisômeros que não apresentam atividade óptica e sua terminologia está centrada em *cis* e *trans* para descrever sua disposição espacial. Isômeros ópticos, comumente chamados de enantiômeros, são aqueles que apresentam atividade óptica, possuindo centros quirais ou centros assimétricos, cujas moléculas são imagens especulares uma da outra, que não se superpõe. A representação de dois enantiômeros e dois diastereoisômeros está esquematizada na **Figura 6** (SOLOMONS, 2000; LIMA, 1997.).

Figura 6: Representação esquemática de dois enantiômeros e dois diastereoisômeros.



Fonte: SOLOMONS, 2000; LIMA, 1997.

A palavra quiral vem da palavra grega, *kheir*, que significa “mão”. Objetos quirais possuem um lado direito e um esquerdo. O termo quiral é utilizado para descrever moléculas de enantiômeros porque estão relacionadas uma com a outra da mesma maneira que a mão direita está relacionada com a mão esquerda. Comumente é utilizada a imagem de duas mãos para demonstrar que um objeto quiral possui uma imagem espelhada não superponível, conforme demonstrado na **Figura 7** (SOLOMONS, 2000).

Figura 7: Imagem especular da mão direita e esquerda.



Fonte: SOLOMONS, 2000.

Enquanto os enantiômeros possuem as mesmas características físicas, como solubilidade ou ponto de fusão, os diastereoisômeros podem apresentar diferentes propriedades físicas e também químicas. Fisicamente, a única diferença entre os isômeros ópticos está no sentido para o qual desviam o plano de vibração de uma luz polarizada: para a direita (sentido horário) ou para a esquerda (sentido anti-horário). Um enantiômero existe sob forma de dois pares de isômeros, não superponíveis, mas simétricos em relação a um plano, apresentando desvios polarimétricos opostos, gerando uma rotação específica da luz plano polarizada (α). Se os dois isômeros estiverem em quantidades iguais, um vai desviar o feixe para esquerda e o outro para direita com a mesma intensidade, de forma que não será observado nenhum desvio da luz (LIMA, 1997).

Misturas contendo quantidades iguais de enantiômeros são chamadas de misturas racêmicas (ou racematos) e são opticamente inativas. As configurações das estruturas indicam a disposição dos átomos ou grupos de átomos ao redor do centro estereogênico. De acordo como o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos R ou S seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido pelos químicos R. S. Cahn, C. K. Ingold e V. Prelog em 1966, e adotado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e não tem nenhuma relação com o desvio da luz polarizada (LIMA, 1997; CAREY, 1992).

Existe também outra nomenclatura atribuída aos enantiômeros e que esta relacionada à sua capacidade de desviar a luz plano polarizada para a direita (D ou +) e para a esquerda (L ou -). Esta propriedade que compostos quirais podem apresentar depende não somente do arranjo espacial dos seus átomos, mas também do meio em que eles se encontram (LIMA, 1997).

2.10 Importância da enantiometria

O início da compreensão dos fenômenos quirais e, conseqüentemente, da estereoquímica, é atribuído em parte a Jean-Baptist Biot, Louis Pasteur e van'Hoff/Le Bel que descobriam, durante o século XIX, a capacidade de alguns compostos de desviar a luz plano polarizada, a assimetria molecular desses compostos e a

configuração tetraédrica do átomo de carbono respectivamente (ORLANDO *et al.*, 2007; HYNECK *et al.*, 1990). A partir dessas descobertas, foi possível compreender que substâncias que não possuem elemento de simetria no arranjo espacial de seus grupos ligantes irão apresentar-se na forma de dois enantiômeros que são imagens especulares entre si (ORLANDO *et al.*, 2007; SOLOMONS, 2000).

Considerou-se durante muito tempo que em uma mistura racêmica biologicamente ativa, um dos enantiômeros seria responsável pela ação (eutômero) e o outro inativo (distômero). Em 1961, com a tragédia da talidomida, este assunto precisou ser reavaliado. O desastre ocorrido com a comercialização deste fármaco como mistura racêmica, mostrou, de forma dramática, os perigos desta concepção, o qual levou à má formação de milhares de fetos, após a ingestão deste fármaco por gestantes. Evidenciou-se que o isômero (+)-(R)- da talidomida tem propriedades sedativas e hipnóticas, enquanto que o isômero (-)-(S)- possui adicionalmente propriedades teratogênicas (BARREIRO *et al.*, 1997).

O episódio da talidomida promoveu um grande desenvolvimento nos estudos relacionando propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas, toxicocinéticas e toxicodinâmicas com a quiralidade e novos modelos de estudos para fármacos quirais foram desenvolvidos. A partir de então, passou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influencia os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (ORLANDO *et al.*, 2007).

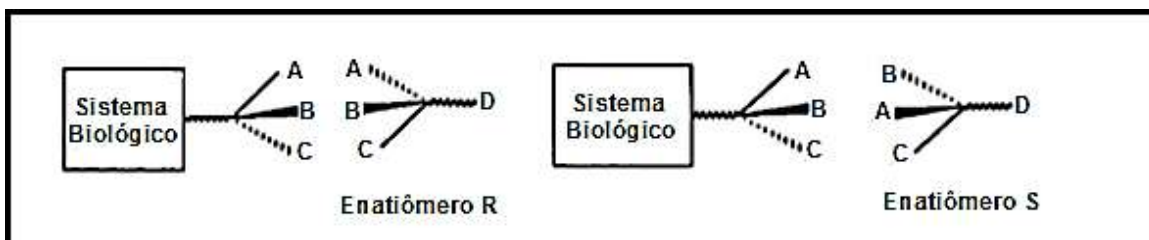
Os enantiômeros apresentam mesmas propriedades físico-químicas, exceto quanto a rotação na luz plano polarizada. Contudo, quando submetidos a ambientes quirais, estes podem apresentar comportamentos diferenciados, mostrando seguidamente diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas devido ao reconhecimento quiral (LIMA, 1997; CAREY, 1992).

No que diz respeito aos compostos quirais, em geral postula-se que existem quatro tipos de comportamentos biológicos esperados: a) a atividade biológica desejada é

atribuída a apenas um dos enantiômeros, enquanto que o outro é inativo; b) os enantiômeros possuem propriedades farmacológicas idênticas (ou próximas), tanto do ponto de vista quali como quantitativo; c) a atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferentes entre os estereoisômeros e d) as atividades dos dois enantiômeros são qualitativamente diferentes. Contudo, esta estreita relação existente entre a atividade farmacológica e a enantiomeria das substâncias ativas é muito forte, pois o grau de estereosseletividade dos receptores biológicos e das enzimas a estas substâncias é igualmente forte. Com o grande avanço das técnicas de separação dos enantiômeros, houve a possibilidade de realização de estudos farmacológicos destes isômeros isolados de sua mistura racêmica (LIMA,1997).

Nos seres vivos existem inúmeras moléculas quirais. A atividade farmacológica de um fármaco depende principalmente da sua interação nestas matrizes ou alvos de fármacos tais como proteínas, ácidos nucleicos e biomembranas (fosfolípidos e glicoproteínas). Como consequência desses arranjos quirais, o organismo dos seres vivos tem a capacidade de diferenciar pares enantioméricos, devido à formação de complexos diastereoisoméricos com diferentes propriedades físico-químicas e consequente diferentes comportamentos no organismo, conforme pode ser observado na **Figura 8** (BARREIRO *et al.*, 1997). Portanto, é compreensível que enantiômeros de um fármaco apresentem frequentemente farmacodinâmica (propriedades farmacológicas e toxicológicas) e farmacocinética diferentes (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (ORLANDO *et al.*, 2007).

Figura 8: Complexos diastereoisoméricos formados pela interação entre um receptor quiral e um par de enantiômeros.



Fonte: ORLANDO *et al.*, 2007.

2.11 Discriminação quiral

Ao longo do último quarto de século, devido ao crescente interesse nos aspectos estereosseletivos e efeitos de fármacos quirais, iniciou-se uma constante preocupação sobre como obter enantiômeros puros. A produção de substâncias enantiomericamente puras se deu pela necessidade de se ter compostos com mais atividade e com menor efeito colateral (BROCKS, MEHVAR, 2003).

Existem duas formas de se obter produtos enantiomericamente puros: (i) realizar uma síntese assimétrica, (ii) síntese aquiral seguida de purificação enantiomérica (BARREIRO *et al.*, 1997).

Estão disponíveis diferentes técnicas para a separação e identificação enantiomérica, tais como cromatografia gasosa, cromatografia a líquido de alta eficiência, cromatografia em camada delgada, cromatografia em fluido supercrítico, eletrocromatografia capilar e eletroforese capilar. Entre eles, a cromatografia a líquido de alta eficiência é o principal método utilizado tanto para fins analíticos quanto preparatórios. A miniaturização da CLAE convencional para a nano-CLAE permite redução do tamanho da amostra e pequeno consumo de solventes tóxicos (AHMED, 2014).

Enantiômeros não são separados por métodos convencionais, uma vez que apresentam propriedades físicas similares, no entanto eles podem ser resolvidos por CLAE tanto pelo método indireto, clássico, de derivação dos enantiômeros com um reagente quiral, levando à formação de um par diastereoisomérico que pode ser separado em colunas aquirais, quanto pelo método direto (CASS *et al.*, 1996).

O método direto baseia-se no uso de aditivos quirais à fase móvel ou no uso de fases estacionárias quirais, sendo este o método preferido para a separação de misturas enantioméricas (CASS *et al.*, 1996; WAINER, 1993; LEVIN, ABU-LAFI, 1993). A razão para tal fato é que não se tem os inconvenientes que o método indireto apresenta e não há desperdício de reagentes quirais, como no caso de adição à fase móvel. A separação de uma mistura enantiomérica em colunas quirais ocorre devido a um

conjunto de interações que levam à formação de um complexo diastereoisomérico transitório. As fases quirais são agrupadas de acordo com estas interações (CASS *et al.*, 1996; CLEVELAND, 1995; WAINER, 1993).

2.12 Fases estacionárias quirais e mecanismos de enantioseparação

O crescente número de fases estacionárias quirais desenvolvidas e comercialmente disponíveis possibilita a separação dos enantiômeros de uma ampla variedade de compostos. Podem ser utilizadas tanto em escala analítica como preparativa. Estas fases são produzidas a partir de pequenas moléculas ou polímeros quirais adsorvidos ou quimicamente ligados a um suporte, geralmente sílica (CASS *et al.*, 2001).

Berthod em 2006, classificou as fases estacionárias quirais de acordo com o tipo de seletor quiral (natural ou sintético) da fase estacionária (**Tabela 6**).

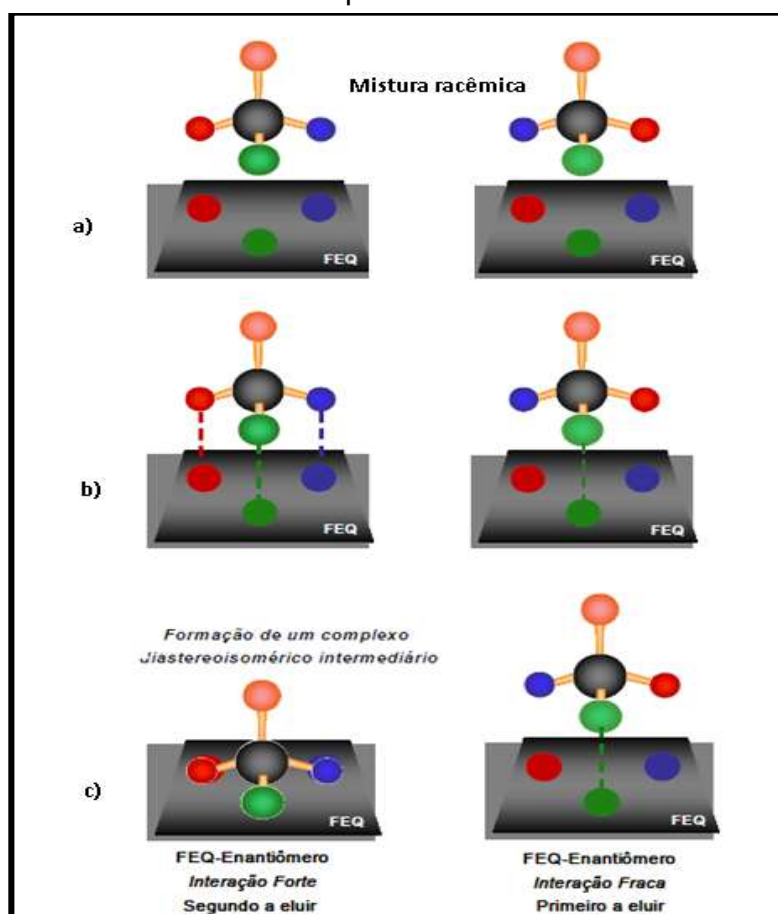
Tabela 6: Seletores quirais e principais interações com analitos quirais.

Seletor quiral	Fases estacionárias quirais	Principais interações
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interações atrativas.
	Glicopeptídeos Macrocíclicos	Complexo de inclusão e interações iônicas
Sintético	Cinchona	Interações eletrostáticas
	Tipo Pirkle	Interação π - π , ligação de hidrogênio
	Troca de ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo
	Éteres de coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo
	Polímeros sintéticos	Interação π - π , ligação de hidrogênio e interação dipolo-
	Polímeros impressos molecularmente (MIPs)	Específico para cada analito

Fonte: BERTHOD, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2010.

O modelo de reconhecimento quiral mais aceito atualmente baseia-se na teoria dos três pontos, proposto por Dagliesh em 1952, o qual relata que são necessários no mínimo três pontos de interação entre o enantiômero e o seletor quiral para que ocorra a resolução dos enantiômeros (BAO *et al.*, 2013), onde no mínimo uma destas interações deve ser estereoespecífica (**Figura 9**). Estas interações precisam ser simultâneas. Dependendo do número de interações existentes entre o seletor quiral e o enantiômero, há formação de dois complexos diastereoisoméricos transitórios com energia livre de Gibbs distinta, e essa diferença de energia determina a ordem de eluição de cada enantiômero, sendo que aquele que forma o complexo menos estável é o primeiro a eluir (VANZOLINI, 2009; BERTHOD, 2006).

Figura 9: Princípio da resolução quiral baseada na teoria dos 3 pontos.



Fonte: VANZOLINI, 2009; BERTHOD, 2006.

A interação entre os analitos e o seletor quiral depende dos grupos funcionais presentes nestas moléculas e arranjos espaciais complementares. O modo como o seletor quiral é fixado no suporte restringe a direção na qual cada enantiômero poderá aproximar e, portanto, viabilizar a realização de três interações distintas para ocorrer a discriminação quiral. As três interações não necessitam ser somente atrativas, tanto forças atrativas quanto repulsivas podem estar envolvidas para gerar a estereoseletividade. O fator chave é obter interações fortes o suficiente para gerar compostos diastereoisoméricos transitórios. Além disso, moléculas dos solventes, o modo de eluição e o modificador orgânico possuem um grande efeito em reduzir ou atenuar as forças de interação requeridas para o reconhecimento quiral (DAVANKOV, 1997).

Os principais tipos de interações, responsáveis pela discriminação entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, são: interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito fortes), interação π - π e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca). As interações coulômbicas e do tipo π - π podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas (LOURENÇO *et al.*, 2010; BERTHOD, 2006).

É importante salientar que a previsão da enantioseletividade utilizando colunas quirais não é um procedimento trivial. Os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito/fase estacionária quiral não são simples e singulares, visto que várias interações simultâneas são requeridas para discriminar um enantiômero do outro. Embora a simulação molecular tenha proporcionado uma compreensão inestimável em relação aos mecanismos de reconhecimento quiral, previsões são ainda largamente baseadas em especulações, regras empíricas ou intuição devido à complexidade das separações enantiosseletivas. Nestes mecanismos, muitas vezes as interações fracas podem desempenhar um papel tão decisivo quanto as interações fortes. Contudo, usualmente, a escolha do seletor quiral é feita considerando as interações mais fortes entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral (YONGZHU *et al.*, 2006; BERTHOD, 2006).

Os métodos cromatográficos desenvolvidos durante este trabalho utilizaram as colunas do tipo glicopeptídeos macrocíclicos e polissacarídeos. Deste modo, estas serão enfatizadas neste documento.

2.13 Fases estacionárias quirais a base de glicopeptídeos macrocíclicos

2.13.1 Características estruturais e mecanismos de reconhecimento quiral

As fases quirais de glicopeptídeos macrocíclicos foram introduzidas por Armstrong, em 1994 e atualmente, apresentam-se dentre as principais classes de fases estacionárias quirais (FEQ) disponíveis comercialmente (LOURENÇO *et al.*, 2010; ARMSTRONG *et al.*, 1994). Antes de 1994, a vancomicina, um tipo de glicopeptídeo macrocíclico, era utilizado como antibiótico no tratamento de infecções bacterianas, por interagir com o grupo terminal presente na parede bacteriana chamado de D-alanil-D-alanina, e impedindo assim, o desenvolvimento deste microrganismo. Deste modo foi pensado que colunas quirais contendo glicopeptídeos macrocíclicos poderiam ser utilizados na separação enantiômerica de aminoácidos. Posteriormente foi avaliado que este tipo de coluna era capaz de separar efetivamente uma variada gama de compostos enantioméricos (SHI XIAO, 2004).

Existem centenas de antibióticos macrocíclicos documentados, contudo, apenas alguns parecem ser eficazes como seletores quirais. Os glicopeptídeos macrocíclicos utilizados para separações quirais em CLAE incluem avoparcina, teicoplanina, teicoplanina aglicona, ristocetina A, vancomicina e análogos (ILISZ *et al.*, 2009).

Atualmente, a empresa Astec comercializa seis tipos de FEQ de antibióticos macrocíclicos: ristocetina A (Chirobiotic® R), vancomicina (Chirobiotic® V e Chirobiotic® V2), teicoplanina (Chirobiotic® T e Chirobiotic® T2) e teicoplanina aglicona (Chirobiotic® TAG) (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

As colunas Chirobiotic® V2 e Chirobiotic® T2 contém os mesmos seletores quirais que as colunas Chirobiotic® V e Chirobiotic® T, respectivamente. Contudo, os seletores são

ligados de formas diferentes na superfície de sílica, o que propicia diferentes sítios de interação com os analitos (BEESLEY, LEE, 2007).

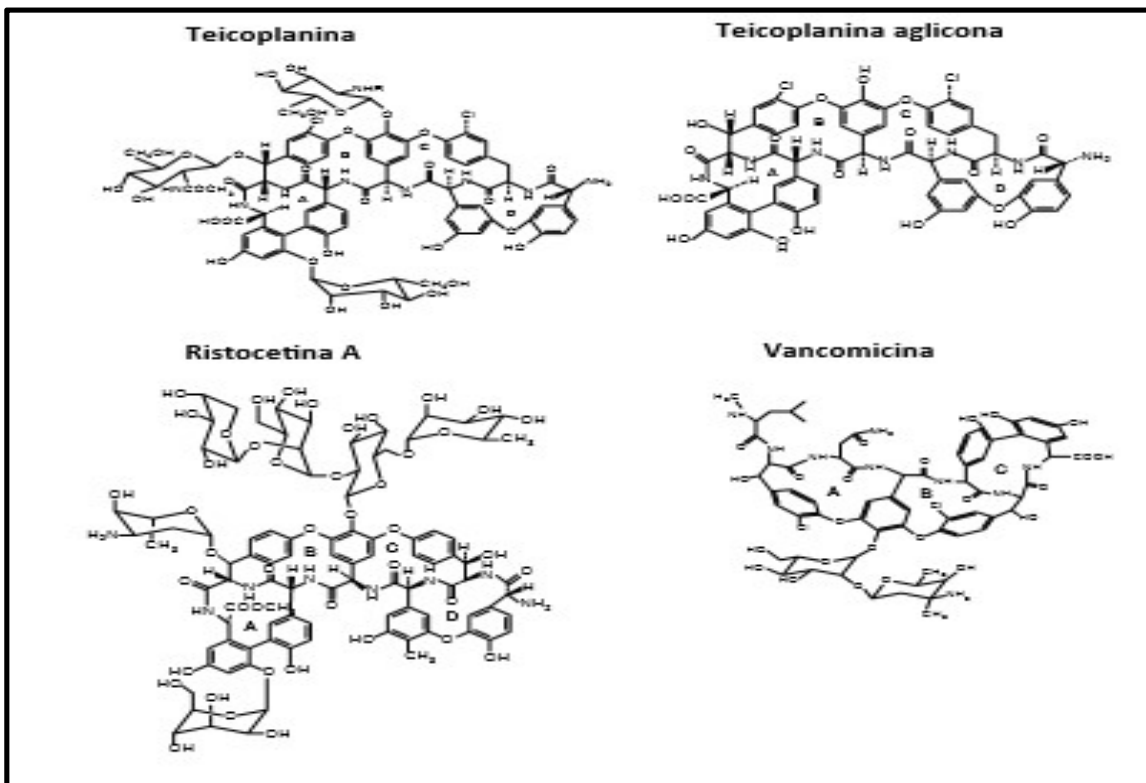
Estes glicopeptídeos macrocíclicos possuem estruturas químicas diferenciadas, contendo porções peptídicas, carboidratos e ácidos carboxílicos ionizáveis ou grupamentos amínicos, que ao interagir com enantiômeros através das diversas interações moleculares possíveis, dão a estes uma alta seletividade para uma ampla variedade de compostos aniônicos, catiônicos e neutros (AHUJA, 2008). Dentre os fármacos enantioméricos resolvidos em colunas baseadas em seletores quirais dessa natureza incluem-se o benoxaprofeno, ibuprofeno, fenoterol, mefobarbital, naproxeno, varfarina, albuterol, citrulina, dopamina, fenilalanina, bupivacaína, temazepam e verapamil (AHUJA, 2008; ARMSTRONG *et al.*, 1994).

Com relação a estas interações entre o analito-seletor quiral, as mais fortes ocorrem a partir de forças coulômbicas, que podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo das cargas presentes nas estruturas envolvidas num dado pH. As ligações de hidrogênio, sempre atrativas e muito fortes, ocorrem principalmente a partir dos grupos hidroxilas ou amino presentes na estrutura do glicopeptídeo. As interações π - π são fortes e podem ser atrativas ou repulsivas e ocorrem, principalmente, devido a presença de sistemas aromáticos. De maneira geral, a interação é mais frequente quando um grupo π -aceptor ou π -ácido do enantiômero interage com um grupo π -doador ou π -básico do seletor, ou vice-versa. Os efeitos estéricos de natureza forte e repulsiva, também são importantes nos mecanismos de retenção e reconhecimento quiral. As forças íon-dipolo, dipolo dipolo e dipolo dipolo induzido são atrativas e ocorrem entre moléculas que apresentam um momento dipolo. As forças de London (ou interações de Van der Waals) são as mais fracas dentre as forças intermoleculares envolvidas. No entanto, são reponsáveis pelo efeito hidrofóbico e/ou pelas forças dirigidas por entropia. Os complexos de inclusão são possíveis, contudo são de fraca intensidade. (LOURENÇO *et al.*, 2010; BERTHOD, 2006).

Estruturalmente a vancomicina, teicoplanina e ristocetina A são glicopeptídeos que consistem de uma parte aglicona no formato de cesta constituída por aneis

macrocíclicos fundidos e uma cadeia com diferentes unidades de açúcares. A teicoplanina aglicona não apresenta as três unidades de carboidratos presentes na teicoplanina, que são substituídos por grupos-OH. As estruturas químicas destes seletos quirais estão representadas na **Figura 10** e os componentes estruturais estão descritos na **Tabela 7** (BERTHOD, 2009; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Figura 10: Estruturas químicas propostas para os glicopeptídeos macrocíclicos teicoplanina, teicoplanina aglicona, ristocetina A e vancomicina. Legenda: A-D demonstram as cavidades de inclusão; grupo R na teicoplanina corresponde, geralmente, ao ácido metil-decanóico.



Fonte: CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004.

Tabela 7: Componentes estruturais dos seletores quirais glicopeptídeos macrocíclicos disponíveis comercialmente

Parâmetros	Teicoplanina	Teicoplanina aglicona	Ristocetina A	Vancomicina
Fórmula química	C ₈₈ H ₉₇ Cl ₂ N ₉ O ₃₃	C ₅₈ H ₄₅ Cl ₂ N ₇ O ₁₈	C ₉₅ H ₁₁₀ N ₈ O ₄₄	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄
Massa molar	1878g mol ⁻¹	1198g mol ⁻¹	2066g mol ⁻¹	1448g mol ⁻¹
Obtenção	Fermentação com <i>Actinoplanis teicomycetus</i>	Hidrólise química da Teicoplanina	Fermentação com <i>Nocardia lurida</i>	Fermentação com <i>Streptomyces orientalis</i>
Centros quirais	23	8	38	18
Macrocíclcos	4	4	4	3
Unidades de açúcar	3	0	6	2
Grupos-OH (fenólicos)	15 (4)	8 (6)	21 (4)	9 (3)
Grupos amínicos	1	1	2	2
Grupos carboxílicos	1	1	0	1
Anéis aromáticos	7	7	7	5
CSP comercial	Chirobiotic T ou T2	Chirobiotic TAG	Chirobiotic R	Chirobiotic V ou V2

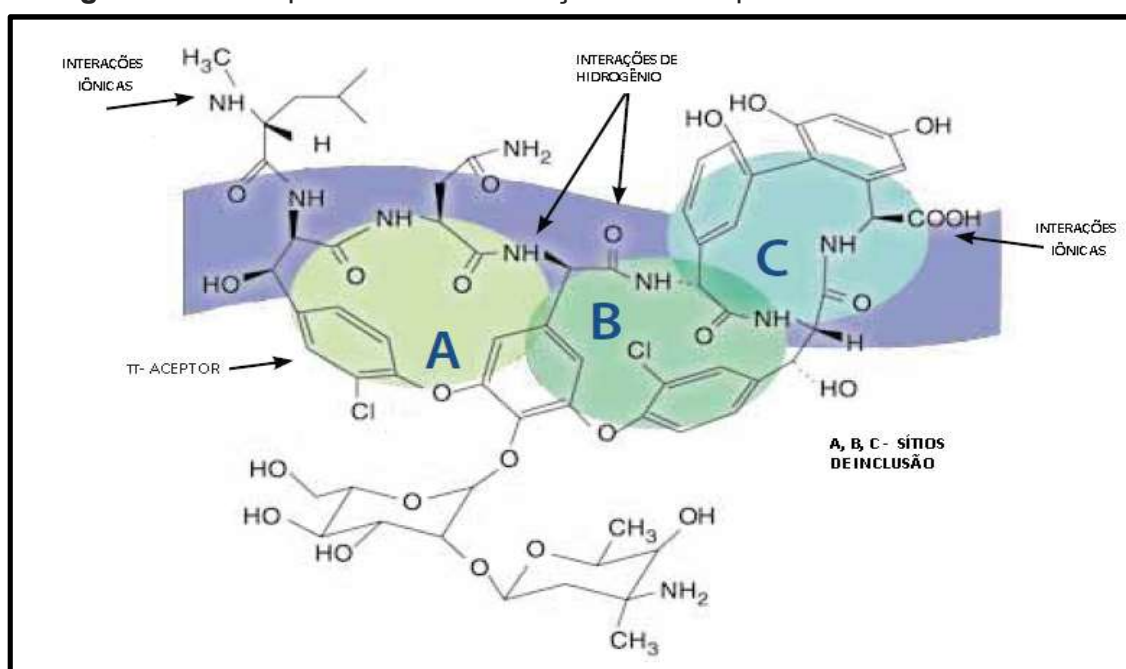
Fonte: BERTHOD, 2009.

Como pode ser observado na **Figura 10** e nos dados da **Tabela 7**, o menor dentre os seletores quirais é a teicoplanina aglicona com 130 átomos e 1198 g.mol⁻¹. A ristocetina A compreende o maior dentre os macrocíclicos descritos, com massa molar de 2066 g.mol⁻¹, e não apresenta átomos de cloro nem ácidos carboxílicos em sua estrutura.

Os grupamentos amínicos e ácidos carboxílicos presentes nos quatro seletores quirais são ionizáveis, com valores de pKa entre 7 e 9 e 2,8 e 4,4, respectivamente. Os grupamentos fenólicos possuem pKa superior a 10 e, portanto, apresentam-se normalmente na sua forma neutra, tendo em vista que as condições experimentais usuais em CLAE exigem valores de pH mais brandos. Todos os glicopeptídeos macrocíclicos possuem grupos ionizáveis que desempenham um papel primordial na sua associação com analitos ionizáveis e conseqüentemente na discriminação quiral (LOURENÇO *et al.*, 2010; BERTHOD, 2006; CASS, DEGANI, 2001).

Conforme discriminado na **Tabela 7**, a vancomicina possui cavidades quirais e diversos tipos de grupos funcionais. Deste modo, a enantioseparação utilizando este seletor quiral pode ocorrer principalmente pelos seguintes mecanismos: formação de complexos de inclusão, ligação de hidrogênio, interações π - π , eletrostáticas, estéricas, dipolo-dipolo e dispersão de London. A **Figura 11** demonstra os principais sítios de interação desta fase quiral (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Figura 11: Principais sítios de interação de fase quiral contendo vancomicina.



Fonte: CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004.

Com relação à polaridade, as colunas contendo glicopeptídeos macrocíclicos não podem ser classificadas como fases apolares, polares e nem iônicas. Todas as quatro FEQ possuem polaridade similar intermediária com sítios ionizáveis, contudo, a ordem de polaridade obtida é: vancomicina > ristocetina A > teicoplanina > teicoplanina aglicona. A polaridade das FEQ afeta, de maneira geral, a retenção dos enantiômeros, mas não é considerada para o reconhecimento quiral (BERTHOD, 2006).

2.13.2 Modos de interação

Os glicopeptídeos macrocíclicos representam um expressivo grupo de FEQ, pois permitem a utilização de diferentes modos cromatográficos, como fase normal (FN), fase reversa (FR), polar-orgânica (PO) com 100% de solvente polar não-aquoso e polar-iônico (PI), com solvente orgânico não-aquoso contendo, principalmente, ácido e/ou base, adicionados para ajustar o estado de ionização do seletor. A fase móvel determina quais interações irão predominar no mecanismo de reconhecimento quiral, fazendo com que a enantioseletividade seja diferente em cada um destes modos cromatográficos. Os modos reverso e polar iônico são os mais utilizados para esse tipo de FEQ (BERTHOD, 2006).

Como as colunas de glicopeptídeos macrocíclicos são ligadas covalentemente à sílica por múltiplas interações (>4), o efeito prejudicial ao alterar de um modo de interação para o outro é praticamente nulo (BEESLEY, LEE, 2007).

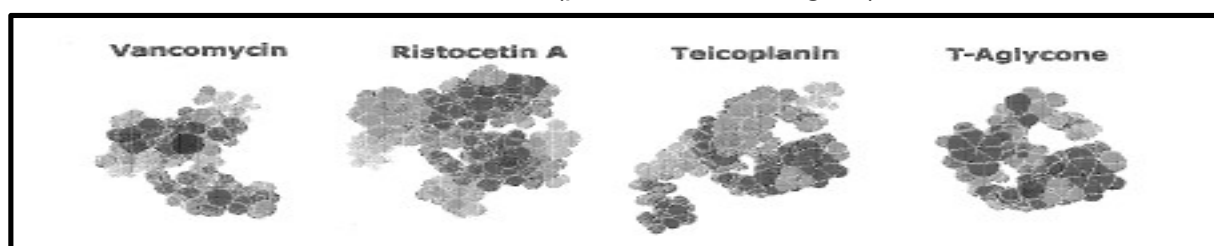
Cada modo de interação possui sua particularidade. No modo reverso, ligações de hidrogênio ocorrem entre o seletor e as moléculas de água presentes na fase móvel, portanto as interações estéricas, hidrofóbicas e coulômbicas são dominantes no processo de retenção e reconhecimento quiral. Por outro lado, em modo polar-iônico, em que não há a presença de água, as interações de hidrogênio tornam-se importantes junto às interações coulômbicas e de efeito estérico. A quantidade de ácido e/ou base contida na fase móvel é responsável pelos estados de ionização dos analitos e do seletor quiral (BEESLEY, LEE, 2007; BERTHOD, 2006).

2.13.2.1 Fase Reversa

No modo de interação reverso, assim como para fases estacionárias aquirais, as FEQ de glicopeptídeos agem como uma fase relativamente apolar e a fase móvel hidro-orgânica relativamente polar. Interações hidrofóbicas entre a parte não polar do analito e o interior da “cesta” do glicopeptídeo constituem o fator predominante da retenção e do reconhecimento quiral. Os possíveis sítios de interação hidrofóbica estão

demonstrados na **Figura 12**. Interações adicionais que podem levar ao reconhecimento quiral incluem principalmente interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações estéricas repulsivas (SHI XIAO, 2004). Para compostos iônicos (ácidos ou bases), os pontos de ancoramento do analito são o grupo carboxil ou o grupo amino, respectivamente. Assim, as interações de hidrogênio e hidrofóbicas são importantes para a discriminação quiral.

Figura 12: Possíveis sítios de interação hidrofóbica das FEQ contendo glicopeptídeos macrocíclicos (parte escura na figura).



Fonte: SHI XIAO, 2004.

O modo de interação reverso envolve o uso de tampão aquoso na composição da fase móvel, sendo que a coluna tolera de 0 a 95% de tampão sem efeito deteriorativo. Neste sistema interações iônicas, interações de hidrogênio e incluições hidrofóbicas podem fornecer o mecanismo necessário para o reconhecimento quiral. Para compostos iônicos (ácidos ou bases) os pontos de ancoramento do analito são o grupo carboxil ou grupo amino respectivamente. Assim as interações de hidrogênio e hidrofóbicas ajudam a concluir a discriminação quiral (BEESLEY, LEE, 2007).

2.13.2.2 Fase polar iônica

Este modo de interação é bastante utilizado devido às fortes interações iônicas, que são características deste tipo de cromatografia. Geralmente, há dois fatores que precisam ser ajustados para otimizar a separação neste modo de interação: a quantidade absoluta de ácido e base adicionada, que é essencial para a otimização da retenção, e a proporção relativa de ácido e base, que controla a seletividade (SHI XIAO, 2004).

Neste modo de interação, se destacam interações iônicas e ligações de hidrogênio entre a fase estacionária quiral e o analito, sendo as interações π - π e estérica consideradas complementares. É importante destacar que a efetividade dessas interações são inversamente proporcionais à distância do centro quiral no analito, ou seja, quanto menor a distância entre o centro quiral e as interações, maior será a seletividade (BEESLEY, LEE, 2007; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

2.13.2.3 Fase normal

No modo de fase normal, no qual a fase móvel é relativamente apolar, a fase estacionária se comporta como uma fase de caráter polar. Os grupos funcionais fortemente polares e os anéis aromáticos da FEQ proporcionam as interações necessárias para retenção e reconhecimento quiral. Portanto, a ligação de hidrogênio, π - π , dipolo e repulsão estérica e, em alguns casos, interações eletrostáticas, são as interações predominantes que ocorrem entre a FEQ e os analitos no modo de fase normal. A ausência de água na fase móvel exclui a possibilidade de interações hidrofóbicas e contribuem para a retenção e seletividade. Contudo, devido à presença de solventes apolares, as interações π - π e dipolo se acentuam e frequentemente compensam as interações hidrofóbicas ausentes (SHI XIAO, 2004).

2.13.2.4 Fase polar orgânica

No modo de interação polar orgânico, a fase móvel é composta de 100% de solvente polar não-aquoso com diferentes níveis de polaridade. As interações predominantes entre o analito e a FEQ usualmente envolvem ligações de hidrogênio, π - π , dipolar e estéricas. É normalmente utilizada para analitos neutros, sem grupos ionizáveis, sendo que para moléculas com capacidades de formar múltiplas ligações de hidrogênio ao redor do centro quiral, este modo de eluição deve ser avaliado primeiramente (BEESLEY, LEE, 2007; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

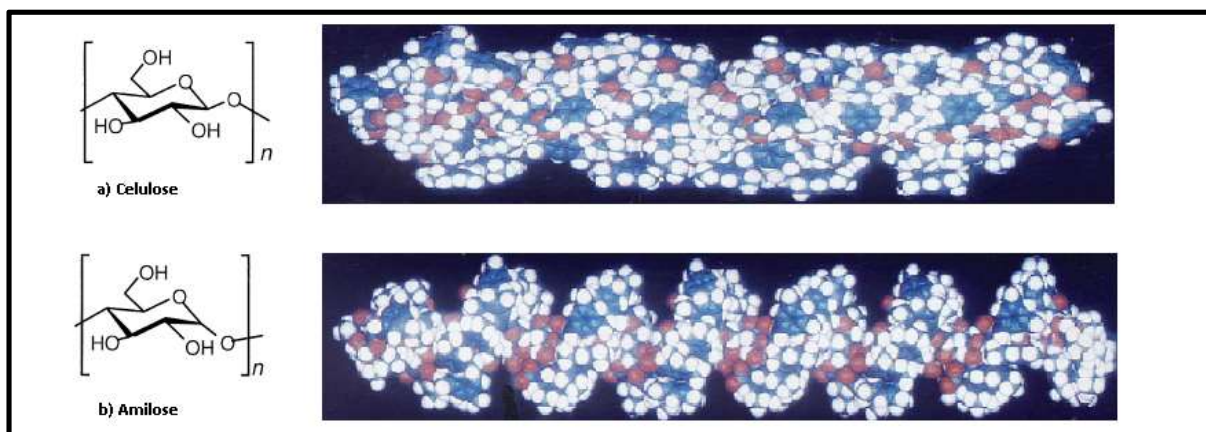
Adicionalmente, acetonitrila, tetrahidrofurano, diclorometano, metiltertbutiléter e dimetilsulfóxido são adicionados na fase móvel para modular as ligações de hidrogênio e melhorar a solubilidade do analito (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

2.14 Fases estacionárias quirais a base de polissacarídeos

2.14.1 Características estruturais e mecanismos de reconhecimento quiral

Em 1951, Kotake e colaboradores (KOTAKE *et al.*, 1951) utilizaram o papel de celulose para resolução enantiomérica de aminoácidos e desde então os polissacarídeos tem sido reconhecidos como potenciais seletores quirais. Os polissacarídeos principais são celulose, amilose, quitosano, xilano, curdilano, dextrano e inulina, destacando-se a celulose e amilose, as quais são polímeros encontrados abundantemente na natureza. (YASHIMA, OKAMOTO, 1997). A celulose é um polímero linear constituído de anéis de D-(+) glicose conectados por ligações β -1,4. A amilose também é constituída por unidades de D-(+) glicose, porém estas são conectadas por ligações α -1-4, conferindo uma estrutura helicoidal. As estruturas dos polímeros estão indicadas na **Figura 13** (RONDEN *et al.*, 1993).

Figura 13: Estrutura química e conformacional da Celulose (a) e Amilose (b).



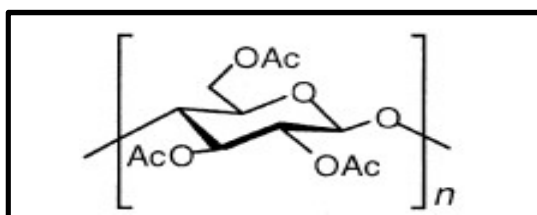
Fonte: RONDEN *et al.*, 1993.

In natura estes compostos apresentam limitada capacidade de resolução quiral devido às fracas propriedades mecânicas, elevada polaridade, baixa capacidade e problemas

de manuseio, de modo que não podem ser utilizados como FEQ comerciais (COLLINS *et al.*, 2006; BONATO, JABOR, 2005; OKAMOTO, YASHIMA, 1997).

Desta forma, foram sintetizados derivados destes polímeros, a fim de elevar a capacidades destes compostos para resolução enantiomérica. O primeiro derivado de polissacarídeos desenvolvido por Hesse e Hangel foi o triacetato de celulose em 1973. A estrutura química está representada na **Figura 14**. Este derivado polimérico foi preparado por acetilação da celulose microcristalina em benzeno, o qual mostrou elevada capacidade de separação enantiosseletiva e foi utilizado para separação de muitos compostos aromáticos e alifáticos (HESSE, HAGEL, 1973).

Figura 14: Estrutura química do polímero de triacetato de celulose.



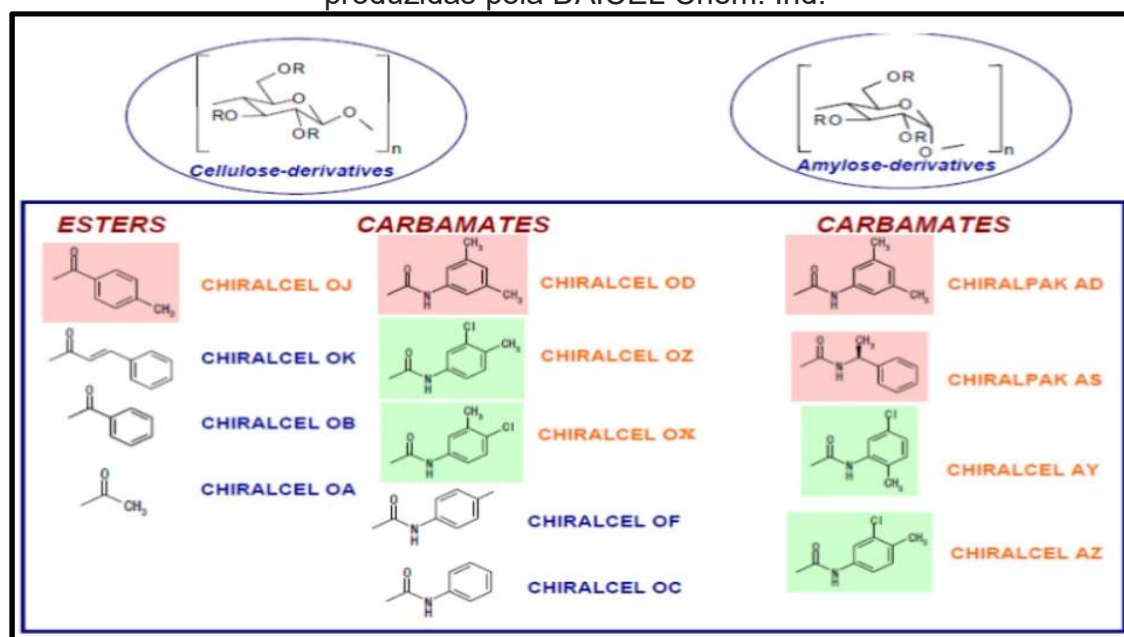
Fonte: HESSE, 1973.

Outro tipo de fase estacionária quiral foi desenvolvida por OKAMOTO e colaboradores (1994). Neste trabalho o triacetato de celulose foi solubilizado e adsorvido em sílica. Esta FEQ apresentou uma enantiosseletividade distinta da fase já apresentada por Hesse e Hangel em 1973, mostrando uma inversão na ordem de eluição dos enantiômeros. (ICHIDA *et al.*, 1984).

A partir de então, inúmeras outras FEQ foram preparadas recobrimo-se partículas de sílica gel macroporosa com derivados de polissacarídeos. Okamoto e seu grupo (1987), relataram diversas fases baseadas em tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-benzilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em 3-aminopropilsílica macroporosa. O suporte de sílica proporcionou a resistência mecânica necessária para obtenção de colunas mais eficientes e estáveis frente a modificação na composição da fase móvel (BONATO, JABOR, 2005).

Os derivados mais utilizados da celulose e amilose são os tri-ésteres e tri-carbamatos. (ALI *et al.*, 2009). A **Figura 15** demonstra algumas fases estacionárias quirais baseadas em derivados de amilose e celulose produzidas pela DAICEL Chem. Ind.

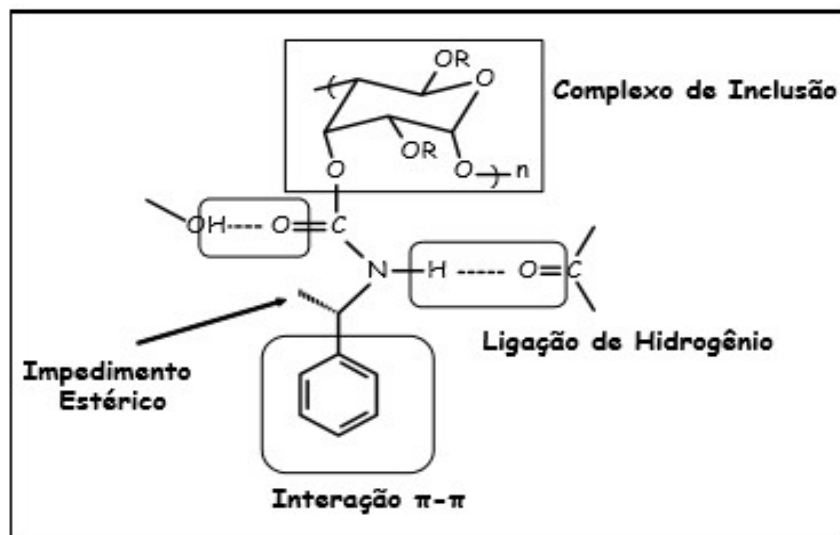
Figura 15: Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de amilose e celulose produzidas pela DAICEL Chem. Ind.



Fonte: DAICEL, 2016a.

As FEQs tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose comercializadas pela Diacel com os nomes comerciais Chiralpack® AD e Chiralcel® OD são bastante estudadas e utilizadas devido a sua grande capacidade de resolução de uma ampla variedade de compostos. A discriminação quiral é possível devido à formação de complexos de inclusão e pelas ligações polares com os grupamentos carbamatos. O grupamento carbamato interage com o analito pela ligação de hidrogênio com –NH e C=O e ligação dipolo-dipolo com o grupamento C=O. Interações π-π também são importantes na resolução quiral de racematos aromáticos. (**Figura 16**). A capacidade de enantioseparação destes derivados é grandemente influenciada pela posição e natureza dos substituintes nos grupos fenila (BELAZ, 2007; ABOUL-ENEIN, ABOU-BASHA, 1996).

Figura 16: Possíveis interações das FEQs derivadas de carbamatos com analitos quirais.



Fonte: ABOUL-ENEIN, 1996; BELAZ, 2007.

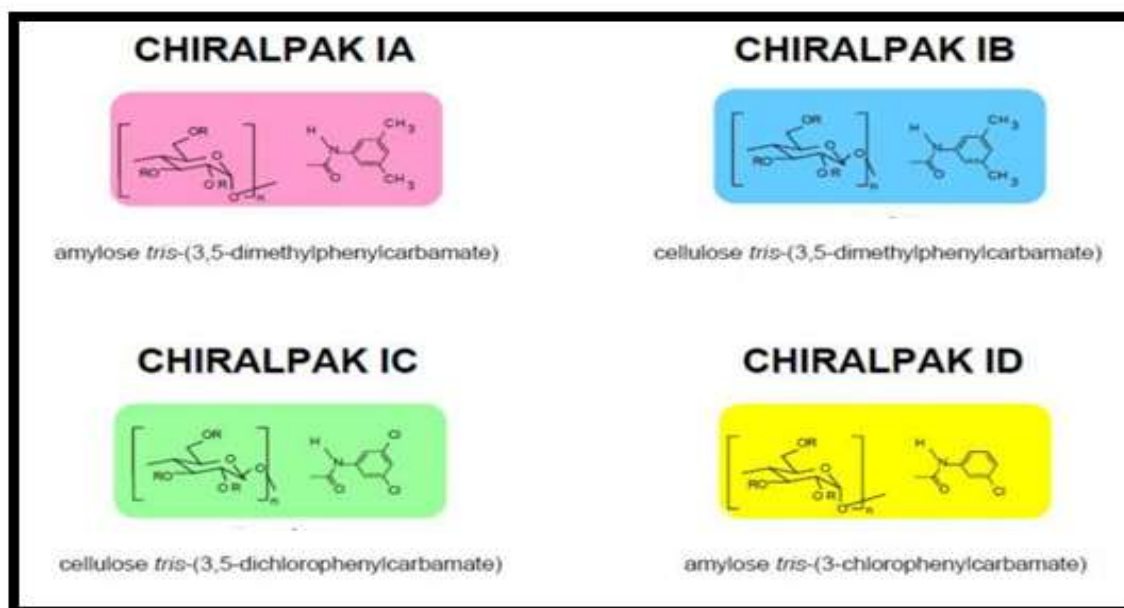
Nas FEQs tris(benzoato) de celulose (Chiralcel OB) e a tris (4-metilbenzoato) de celulose (Chiralcel OJ), a discriminação quiral pode ocorrer pela interação dos grupos carbonila dos ésteres com os enantiômeros por meio de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Wainer e colaboradores propuseram o mecanismo de reconhecimento quiral por meio da formação de complexos de inclusão, devido ao encaixe da porção aromática do analito na cavidade quiral da fase estacionária. Os complexos formados são estabilizados por interações estéricas e ligação de hidrogênio (ALI, *et al.*, 2006; OKAMOTO; KAIDA, 1990).

As FEQs baseadas em polissacarídeos podem ser utilizadas por meio de três modos de interação: normal, reverso e polar orgânico. Embora estas colunas apresentem uma grande aplicabilidade na discriminação de várias misturas enantioméricas, solventes não usuais como tetrahidrofurano (THF), acetato de etila, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, diclorometano e tolueno não podem ser utilizados, uma vez que podem solubilizar o seletor quiral adsorvido na sílica (LOURENÇO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2007).

Com a motivação de ampliar o escopo de aplicação das FEQs contendo derivados de polissacarídeos podendo utilizá-las com uma variedade maior de solventes, vários grupos de pesquisa investigaram a possibilidade de imobilizar estes derivados polissacarídeos nas matrizes cromatográficas, mais comumente na sílica gel (ZHANG, FRANCO, 2008). As primeiras FEQs foram desenvolvidas por Okamoto e colaboradores (1987), ao ligar covalentemente o tris(3,5-dimetilcarbamato) e o tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose à 3-aminopropilsílica.

Após mais de uma década de pesquisa neste tópico, as primeiras FEQs foram disponibilizadas comercialmente pela Daicel: Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC, Chiralpak ID (**Figura 17**).

Figura 17: Fórmula estrutural das colunas cromatográficas Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC, Chiralpak ID.



Fonte: OKAMOTO *et al.*, 1987

Devido a sua natureza imobilizada, estas FEQs combinam a vantagem das colunas tipo polissacarídeos adsorvidos, ao manter a ampla capacidade de discriminação quiral em cromatografia analítica e preparativa, e acrescentam uma maior robustez da coluna

devido a uma compatibilidade ilimitada com inúmeros solventes, estendendo assim sua faixa de aplicação (ZHANG, FRANCO, 2008).

As FEQs baseadas em polissacarídeos, tanto adsorvidas quanto quimicamente ligadas ao suporte (imobilizadas), apresentam grande aplicabilidade devido ao alto poder de enantioresolução, tanto em escala preparativa quanto analítica (BELAZ, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos quirais para quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos e em plasma humano, visando a monitorização terapêutica destes enantiômeros.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método analítico empregando cromatografia quiral por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) e coluna a base de glicopeptídeos macrocíclicos para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos.
- Avaliar a proporção dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos atualmente utilizados no país para tratamento de malária, utilizando o método validado.
- Desenvolver e validar método analítico empregando cromatografia quiral por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) e coluna a base de polissacarídeos para quantificação dos enantiômeros da cloroquina.
- Desenvolver método bioanalítico por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em plasma humano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR), IFA e comprimidos

- Difosfato de cloroquina SQR – fabricado por Sigma-Aldrich. Lote: P500258. Teor: 99,6%. Válido durante o período de estudo.
- Difosfato de cloroquina IFA (insumo farmacêutico ativo) – fabricado por IPCA Laboratories (Índia). Importado por Pharmanostra. Lote 3010C3RJA/13062123C. Válido durante o período de estudo.
- Difosfato de cloroquina comprimidos (150 mg de cloroquina base) – fabricados por LQFEx – Laboratório Químico Farmacêutico do Exército. Lote 1504614. Válido durante o período de estudo.
- Difosfato de cloroquina comprimidos (150 mg de cloroquina base) – fabricados por Farmanguinhos. Lote 1606EX088. Válido durante o período de estudo.
- Difosfato de cloroquina comprimidos (150 mg de cloroquina base) – fabricados por Farmanguinhos. Lote 15050464. Válido durante o período de estudo.
- Dicloridrato de Amodiaquina Diidratado SQR - fabricado por Sigma-Aldrich. Lote: 038F0993V. Válido durante o período de estudo.

4.1.2 Reagentes e Vidraria

- Reagentes grau analítico:
 - Ácido clorídrico (HCl) – Sigma Aldrich®
 - Cloreto férrico hexa-hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – Synth®
 - Hidróxido de sódio (NaOH) – Synth®
 - Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – Synth®
 - Formiato de amônio – (NH_4HCO_2) - Spectrum®
- Reagentes grau cromatográfico:
 - Acetonitrila – J. T. Baker®
 - Metanol – Sigma Aldrich®

-
- Trietilamina - Tedia®
 - Ácido acético - Labsynth®
 - Dietilamina - Merk®
 - Hidróxido de amônio - Tedia®
 - Hexano - J. T. Baker®
 - Isopropanol – Sigma-Aldrich®
 - Metil-ter-butil éter - Sigma-Aldrich®
 - Etanol - Proquimicos®
- Água destilada e deionizada em sistema Millipore®
 - Pipetas, buretas e balões volumétricos calibrados
 - Béqueres, erlenmeyers, tubos de ensaio, gral, pistilo, seringas e kit de filtração

4.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom Unique®, modelo 1400
- Balança analítica Sartorius® com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D
- Coluna cromatográfica Sigma® Chirobiotic V – vancomicina, 5 µm, 100 x 2,1 mm
- Coluna cromatográfica Daicel® Chiralpak ID - amilose tris(3-clorofenilcarbamato), 5 µm, 250 x 4,6 mm
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent modelo 1100, com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Thermo Finnigan Surveyor com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu XFLC, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent® 1200 series, acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 3200 (AB Sciex)
- Estufa Nabertherm®, modelo TR 60
- Filtros para seringa Sartorius® 0,45 µm
- Lâmpada luz do dia plus Sylvania® 20 W
- Lâmpada UV SCT® 8 W
- Sistema de purificação de água Millipore®, modelo Diect Q3

-
- Polarímetro digital Bellinghan Stanley® modelo ADP 440
 - Software Excell® 2010

4.2 Métodos

4.2.1 Análise do difosfato de cloroquina IFA por polarimetria

Para avaliação do poder rotatório, preparou-se uma solução amostra utilizando o insumo farmacêutico ativo difosfato de cloroquina, em duplicada, a 1% em água. As medidas do poder rotatório foram realizadas em um polarímetro a 589 nm e 25 °C, utilizando-se um tubo de 2,0 dm. Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, o limite especificado em relação ao desvio da luz plano polarizada para insumos farmacêuticos que são misturas racêmicas é de $-0,1^\circ$ a $+0,1^\circ$.

4.2.2 Determinação de peso dos comprimidos

Para a determinação de peso dos comprimidos de difosfato de cloroquina, foram pesados, individualmente, 20 comprimidos e o peso médio foi determinado. Considerando o peso médios dos comprimidos analisados (> 250 mg), o limite de variação especificado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição em relação ao peso médio é de $\pm 5,0\%$, não mais que duas unidades podem estar fora dos limites e nenhuma unidade pode apresentar valores fora do limite de $\pm 10\%$ (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos

A partir de informações obtidas na literatura científica sobre determinação dos enantiômeros de cloroquina por CLAE e desenvolvimento de método analítico quiral, foram propostos sistemas cromatográficos para separação e quantificação dos enantiômeros de difosfato de cloroquina presentes em comprimido.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a separação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina e a adequabilidade do sistema, em cada condição testada, foram tempo de retenção (Tr), resolução entre os picos (R), número de pratos teóricos e simetria (S).

4.2.3.1 Seleção da coluna cromatográfica e modo de interação

As colunas de glicopeptídeos macrocíclicos são fases estacionárias multimodais, sendo possível utilizar mais de um sistema de fase móvel sem que ocorram efeitos deteriorativos na coluna. Para seleção da fase estacionária/fase móvel a ser utilizada, a estrutura da molécula foi avaliada a fim de subsidiar a escolha. A **Tabela 8** sumariza a relação entre a FEQ, modo de interação e o tipo de composto a ser analisado (BEESLEY, LEE, 2007).

Tabela 8: Relação entre a FEQ, modo de interação e o tipo de composto a ser analisado. A marcação dupla significa que a seleção é preferível.

FEQ	Moléculas						
	Ácidas (-)		Básicas (+)		Neutras		
	Polar Iônico	Fase Reversa	Polar Iônico	Fase Reversa	Polar Orgânico	Fase Normal	Fase Reversa
Vancomicina		V	V	V	V	V	V V
Vancominina A			V V	V V	V	V	V
Teicoplanina	V V	V V	V V	V	V	V	V V
Teicoplanina A	V V	V V	V V	V	V	V	V
Teicoplanina aglicona	V V	V V	V		V V	V V	V
Ristocetina A	V V	V V			V	V	V V

Fonte: BEESLEY, LEE, 2007.

Tendo em vista que a cloroquina é uma molécula de caráter básico, a coluna cromatográfica de escolha foi a Chirobiotic V (seletor quiral vancomicina). Além disso, esta coluna já foi previamente utilizada para separação dos enantiômeros da cloroquina por Magalhães e Bonato em 2008. Os modos de interação testados foram o polar iônico e modo reverso.

Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo Agilent HP 1100 com detector DAD e no cromatógrafo Thermo Finnigan Surveyor com detector DAD. Utilizou-se coluna cromatográfica Chirobiotic V de 10 cm comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 μm , empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo vancomicina.

Diferentes composições de fase móvel foram testadas tanto para o modo polar iônico quanto no modo reverso. Variaram-se, ainda, o volume de injeção, a temperatura da coluna e o fluxo da fase móvel.

Modo polar iônico

A **Tabela 9** sugere o protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo polar iônico utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Tabela 9: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo polar iônico utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V.

Tipo de fase móvel	Fase móvel inicial (screening)	Otimização
Polar iônico	100/0,1/0,1 (v/v/v) metanol: ácido acético: trietilamina	- alterar razão ácido/base - alterar o tipo de ácido/base - substituir o ácido/base por sal volátil - adicionar acetonitrila

Fonte: CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004.

Durante o desenvolvimento do método analítico quiral utilizando-se o modo polar iônico, selecionou-se inicialmente a fase móvel contendo metanol, ácido acético e trietilamina. Em seguida foi incluída a acetonitrila nesta fase. Também foi avaliada a substituição da trietilamina por hidróxido de amônio e dietilamina. Posteriormente, ainda foi avaliada a fase móvel constituída de metanol e formiato de amônio, em diferentes proporções.

Modo Reverso

A **Tabela 10** sugere o protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo reverso utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Tabela 10: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo reverso utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V.

Tipo de fase móvel	Fase móvel inicial (screening)	Otimização
Fase Reversa	30:70 metanol ou acetonitrila: acetato de amônio 20 mM, pH 5,0	- alterar proporção do modificador orgânico e tampão - alterar tipo do modificador orgânico - alterar tipo de tampão

Fonte: CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004.

Durante o desenvolvimento do método analítico quiral utilizando-se o modo reverso, selecionou-se a fase móvel contendo metanol e tampão acetato de amônio 20 mM (pH 5,0), em diferentes proporções

4.2.4 Validação do método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido

O método analítico desenvolvido para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos por CLAE foi validado de acordo com os parâmetros e especificações estabelecidos na Resolução RE nº 899 (2003), no Guia ICH-Q2(R1) (2005) e procedimento de validação intralaboratorial definidos por Souza (2007).

Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Todos os cálculos foram feitos com auxílio do *software Microsoft Excel 2010*®.

De acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos), o método de doseamento enquadra-se na categoria I (Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), semelhante à especificação do guia ICH Q2 (R1).

4.2.4.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo provido de detector de arranjo de diodos (DAD) com detecção a 258 nm e coluna Chirobiotic V® (150 x 2,1 mm, 5 µm), mantida a 25 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. O volume de injeção utilizado foi de 10 µL e os espectros na região do ultravioleta foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para identificação dos picos cromatográficos.

Para adequabilidade do sistema, foi considerado um desvio padrão relativo de no máximo 2,0% entre as áreas dos picos da solução padrão, injetada em quintuplicata.

4.2.4.2 Preparo das soluções

Solução padrão de difosfato de cloroquina

Aproximadamente 6,0 mg de difosfato de cloroquina SQR (corresponde a 3,72039 mg de cloroquina base livre), foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se aproximadamente 8 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução a 0,06 mg.mL⁻¹ de difosfato de cloroquina. Por se tratar de uma mistura racêmica, que por definição contém na sua composição quantidades equivalentes dos enantiômeros, foi considerada por extrapolação, a concentração na solução final de 0,03 mg.mL⁻¹ para cada enantiômero do difosfato de cloroquina.

Solução amostra de difosfato de cloroquina

Inicialmente determinou-se o peso médio de 20 comprimidos. Os comprimidos foram pulverizados até a obtenção de pó fino e homogêneo. Pesou-se, exatamente, quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução a $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$ de difosfato de cloroquina. Assim como na solução padrão, foi considerada a concentração na solução final de $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ para cada enantiômero do difosfato de cloroquina.

Placebo

O placebo foi preparado empregando-se os excipientes presentes nos comprimidos de cloroquina. A formulação qualitativa foi fornecida pela indústria farmacêutica Farmanginhos e a formulação quantitativa foi determinada de acordo com os limites estabelecidos pela *Handbook of Pharmaceutical Excipients* e está descrita na **Tabela 11**. O placebo equivale à aproximadamente 44,4% da formulação, sendo o restante correspondente ao ativo.

Tabela 11: Excipientes utilizados no preparo do placebo

Excipiente	Função farmacotécnica	Quantidade recomendada (%)	Quantidade utilizada (%)
Amido de milho	Desintegrante	3 a 25	25
Manitol	Diluente	10 a 90	16,4
Talco	Deslizante	1 a 10	1
Estearato de magnésio	Lubrificante	0,25 a 5	2

Fonte: HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2006.

Solução placebo

Pesou-se, exatamente, quantidade do placebo equivalente a 0,12402 pesos médios para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1

mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol.

4.2.4.3 Parâmetros de validação

Seletividade

A seletividade é um parâmetro da validação analítica o qual avalia a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Deste modo é possível avaliar se existem compostos coeluintes no mesmo tempo de retenção do pico do composto de interesse (BRASIL, 2003b).

Para a determinação da seletividade, foram injetados diluente, solução placebo, solução padrão e solução amostra na concentração de trabalho. Foi avaliada a pureza espectral dos picos, ao comparar a sobreposição dos espectros na região do ultravioleta obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico, utilizando um detector DAD.

A seletividade também foi avaliada frente aos produtos de degradação, quando a cloroquina foi submetida a condições de estresse por hidrólise ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e oxidação. Paralelamente, foram preparadas solução amostra controle e solução padrão e determinou-se a porcentagem de degradação do fármaco em cada condição de estresse. Foi avaliada a capacidade do método analítico de separar os picos de interesse dos possíveis produtos de degradação. Além disso, as purezas dos picos de interesse foram verificadas. O preparo das amostras de cloroquina submetidas às condições de estresse está descrito a seguir.

Hidrólise ácida: transferiu-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de HCl 1 M, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Após 3 dias em temperatura ambiente,

retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de NaOH 1 M para neutralização e completou-se o volume com metanol.

Hidrólise básica: transferiu-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina para um balão volumétrico de 50 mL. Como o difosfato de cloroquina não é solúvel no meio básico, adicionaram-se 40 mL de água purificada para solubilização. Posteriormente, adicionaram-se 10 mL de NaOH 5 M, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Após 3 dias em temperatura ambiente, retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de HCl 1 M para neutralização e completou-se o volume com metanol.

Oxidação: transferiu-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de H₂O₂ 3% v/v em água, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Após 3 dias em temperatura ambiente, a solução foi deixada em banho-maria a 60 °C por 2 horas. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol.

Exposição ao calor seco: transferiu-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina para tubo de vidro âmbar com tampa. O tubo foi exposto a 105 °C em estufa por 3 dias. Em seguida, transferiu-se o pó para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol.

Exposição à radiação UV: transferiu-se quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 30 mg de difosfato de cloroquina para vidro relógio. A amostra foi exposta à radiação UV-visível por 3 dias. Ao final, transferiu-se o pó para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol.

Utilizou-se, para a realização deste teste, câmara de fotoestabilidade dotada por um envoltório de madeira, vedado, com duas lâmpadas de luz visível e uma lâmpada de luz UV, além de ventilador, para manter homogênea a temperatura dentro da câmara.

Linearidade

A linearidade avalia a capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003).

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva analíticas contendo 5 níveis na faixa de 80% a 120% concentrações de trabalho dos analitos. Para tanto, foi preparada em triplicata uma solução padrão estoque. A partir desta solução, foram preparadas soluções diluídas em cinco diferentes concentrações, transferindo-se uma alíquota da solução padrão estoque para balão volumétrico de 5 mL e completando-se o volume com metanol conforme descrito na **Tabela 12**.

Solução padrão estoque de difosfato de cloroquina

Aproximadamente 6,0 mg de difosfato de cloroquina SQR (corresponde a 3,72039 mg de cloroquina base livre), foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se aproximadamente 8 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente obtendo-se uma solução a $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada enantiômero do difosfato de cloroquina.

Tabela 12: Preparo das soluções padrão de difosfato de cloroquina para avaliação da linearidade do método analítico.

Nível de concentração	Alíquota da solução padrão estoque (mL)	Concentração dos enantiômeros ($\mu\text{g/mL}$)
1 (80%)	0,40	24
2 (90%)	0,45	27
3 (100%)	0,50	30
4 (110%)	0,55	33
5 (120%)	0,60	36

Os *outliers* (valores dispersos) foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife ($\alpha = 0,05$), utilizando o critério de aceitação de que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração podem ser excluídos. Além disso, se o ponto for a terceira e última replicata do nível de concentração, este não pode ser excluído (SOUZA, 2007).

Posteriormente, foram utilizados testes estatísticos a fim de verificar se os dados de regressão linear atendem às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), sugerido por Souza e Junqueira (2005). O MMQO ou regressão linear simples, parte das premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são independentes e possuem variância constante ao longo do eixo x. Estas premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade através do teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson. Em seguida, verificou-se a adequação dos dados ao modelo linear, ou seja, verificou-se se a regressão é significativa e se o desvio da linearidade não é significativo utilizando a análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; INMETRO 2003).

Por último, construíram-se as curvas analíticas com os valores de área sob o pico dos enantiômeros do difosfato de cloroquina, obtidas para cada nível de concentração, determinou-se o coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a) e o gráfico de distribuição dos resíduos. A regressão linear foi calculada pelo MMQO.

Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra. Na validação de método, este parâmetro é considerado em três níveis diferentes: repetitividade (intra-corrída), precisão intermediária (inter-corrídas) e reprodutibilidade. Usualmente a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2003).

Nesta validação, foram avaliadas as precisões intra-corrída e inter-corrídas. Para determinação da precisão intra-corrída, avaliou-se a concordância entre resultados obtidos na análise de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (0,03 mg.mL⁻¹ de cada enantiômero). Para avaliação da precisão inter-corrídas, foi adotado o mesmo procedimento, realizando-se as análises em dois dias consecutivos por dois analistas diferentes.

Determinou-se o teor dos enantiômeros de difosfato de cloroquina e o desvio padrão relativo (DPR). A RE n.º 899 (2003) determina o valor máximo aceitável do DPR de 5%, contudo no presente trabalho foi determinado como valor máximo aceitável do DPR de 2% (RIBANI *et al.*, 2004).

Utilizou-se o teste *t* de Student com o objetivo de avaliar a diferença entre as a média dos resultados obtidos nos dois dias consecutivos, a fim de avaliar o nível de confiança associado ao significado da comparação.

Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (INMETRO, 2003).

A exatidão do método foi avaliada pelo método do placebo contaminado, em três níveis de concentração (80%, 100% e 120% da concentração de trabalho). Quantidades

conhecidas de difosfato de cloroquina IFA foram adicionadas a uma mistura dos excipientes do comprimido. A composição do placebo utilizado está descrita no item 4.2.4.2.

Para cada nível de concentração, foram preparadas três soluções. Para o preparo de cada solução, adicionaram-se 24 mg de placebo e massa de difosfato de cloroquina correspondente à concentração desejada, conforme especificado na **Tabela 13**.

Tabela 13: Massas pesadas de difosfato de cloroquina IFA e placebo para solução estoque.

Nível (%)	Placebo (mg)	Massa de difosfato de cloroquina (mg)	Concentração dos enantiômeros (µg/mL)
80	24	24	24
100	24	30	30
120	24	36	36

As massas especificadas na **Tabela 13** foram exatamente pesadas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se aproximadamente 40 mL de água purificada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se com auxílio de uma pipeta automática, uma alíquota de 1 mL desta solução que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol. Determinou-se a concentração de cada solução analisada e a taxa de recuperação em cada nível de concentração.

A RE n.º 899 (2003) da ANVISA não determina critérios de aceitabilidade para as porcentagens individuais de recuperação. Deste modo, foi utilizado o critério de que as porcentagens devem estar contidas na faixa de 98 a 102% (GREEN, 1996).

Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção é caracterizado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação é estabelecido pela menor quantidade do analito em uma

amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003b).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através da média das inclinações e desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas de cada enantiômero, de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente, utilizando os dados obtidos das curvas analíticas do ensaio de linearidade.

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{b} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{b} \quad (2)$$

Em que DPa é o desvio padrão do intercepto e b é a média das inclinações da curva analítica.

Robustez

A robustez avalia a sensibilidade de um método frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Um método é considerado robusto quando se revela praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2003).

A robustez foi avaliada por meio da análise de soluções amostra a 100% da concentração de trabalho, em triplicata, variando-se as condições analíticas descritas na **Tabela 14**, a fim de observar redução de áreas sob os picos ou aparecimento de picos referentes à degradação do difosfato de cloroquina.

Tabela 14: Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de difosfato de cloroquina.

Parâmetro	Nominal	Variação
Fluxo da Fase Móvel	1,0 mL/minuto	0,9 mL/minuto e 1,1 mL/minuto
Temperatura do forno	25 °C	23°C e 27°C
Tempo de agitação no ultrassom	15 min	20 min
Estabilidade da solução de trabalho	-	24 horas após preparo

Em cada condição, os teores dos enantiômeros do difosfato de cloroquina foram determinados e os valores obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por meio do teste *t* de Student e desvio padrão relativo (DPR).

4.2.5 Quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos

Amostras de comprimidos contendo 150 mg de cloroquina referente a 2 lotes doados pelo Laboratório Farmacêutico Federal Farmanguinhos (1606EX088 e 15050464) foram analisados utilizando-se o método proposto.

Para realização do doseamento, 20 comprimidos foram pesados e pulverizados. As soluções padrão e amostras dos comprimidos foram preparadas conforme descrito na seção 4.2.4.2. Cada lote foi analisado em triplicata, sendo o resultado apresentado pela média dos valores encontrados.

Foi utilizada a especificação de teor de 93,0 a 107,0%, conforme indicado na monografia de difosfato de cloroquina comprimidos, da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.6 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina utilizando coluna tipo polissacarídeos

Em uma parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Ashraf Ghanem, da Universidade de Canberra na Austrália, foi avaliada a separação dos enantiômeros da cloroquina utilizando um cromatógrafo Shimadzu e coluna cromatográfica Chiralpak ID (Daicel Chem. Ind.), de 250 mm comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 μm , empacotada com amilose tris(3-clorofenilcarbamato) imobilizada em sílica.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a separação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina e a adequabilidade do sistema em cada condição testada foram tempo de retenção (T_r), resolução entre os picos (R), número de pratos teóricos e simetria (S).

A coluna Chiralpak ID pode ser utilizada no modo normal ou reverso. Devido ao fato desta fase estacionária possuir o seletor quiral imobilizado em sílica, pode-se utilizar no modo normal vários tipos de solventes orgânicos sem danificar a coluna, progredindo das fases móveis comumente utilizadas, como misturas contendo alcano e álcool, para fases contendo metil-tertbutil éter, tetrahidrofurano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. No modo reverso, é comumente utilizado um tampão aquoso e um modificador orgânico como metanol ou acetonitrila (DAICEL, 2016a).

A **Tabela 15** sugere o protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo reverso utilizando a coluna cromatográfica (DAICEL, 2016a, DAICEL, 2016b).

Tabela 15: Protocolo inicial para desenvolvimento de método quiral no modo normal e reverso utilizando a coluna cromatográfica Chiralpak ID.

Modo de interação	Fase móvel inicial para compostos básicos (screening)	Otimização
Fase Reversa	40:60 Modificador orgânico (metanol ou acetonitrila): tampão aquoso (tampão borato 20 mM, pH 9,0 ou tampão fosfato 20 mM pH 8,0)	- alterar proporção do modificador orgânico e tampão - alterar tipo do modificador orgânico - alterar tipo de tampão
Fase Normal	80:20 Alcano:2-propanol Adicionar 0,1% Trietilamina	- alterar proporção de solventes - alterar tipo de solvente

Fonte: DAICEL, 2016a, DAICEL, 2016b.

Diferentes composições de fase móvel foram testadas tanto para o modo normal quanto reverso. No modo normal foram avaliadas fases móveis contendo hexano, isopropanol, trietilamina, metil-ter-butil éter e etanol. No modo reverso, foram avaliadas fases móveis contendo metanol, acetonitrila, trietilamina, etanol e água. Variaram-se, ainda, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel.

4.2.7 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em plasma utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos

Para o desenvolvimento de um método de quantificação dos enantiômeros de cloroquina em plasma humano por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas sequencial (CLAE-MS-MS), foram otimizados os parâmetros de detecção e as condições cromatográficas estabelecidos para quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos. O cromatógrafo utilizado foi Agilent 1200 acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização electrospray API 3200 (AB Sciex Instruments).

Para a detecção por espectrometria de massas, procedeu-se com a avaliação e otimização da detecção por infusão direta da solução do fármaco. Foram avaliadas, isoladamente, soluções de cloroquina a 2000 ng/mL e de amodiaquina (padrão interno) a 4000 ng/mL, ambas em metanol. A ionização foi realizada por *electrospray* no modo positivo (ESI(+)).

No modo ESI(+), foram otimizados os parâmetros para obtenção de íons precursores $[M+H]^+$ de alta intensidade nos espectros de massa (*MS scan*). Após a seleção do íon precursor, buscou-se a obtenção de fragmentos de alta intensidade nos espectros de fragmentação (*Daughter Scan*) com a otimização da energia de colisão (V).

Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas estabelecidas e validadas para quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos. Foi utilizada coluna Chirobiotic V® (100 x 2,1 mm, 5 µm), mantida a 25 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol, ácido acético e trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. Posteriormente, os parâmetros foram otimizados de acordo com os melhores resultados em relação à intensidade do sinal dos fármacos no espectrômetro de massas.

O procedimento de extração das amostras foi previamente estabelecido por Miranda (2013) e consistem em uma extração líquido-líquido. Para a avaliação da extração líquido-líquido, uma alíquota de 50 µL da solução de padrão interno foi adicionada em 250 µL de plasma branco em tubos de 10 mL. Agitou-se em vórtex por cinco segundos, e em seguida adicionou-se 2 mL de solvente extrator composto de acetato de etila: metil-ter-butyl éter (1:1) e agitou-se por 60 segundos. Centrifugou-se por cinco minutos, a 3500 rpm e temperatura de 5 °C. Uma quantidade de 1,6 mL do sobrenadante foi transferida para outro tubo de vidro. Evaporou-se em concentrador de amostras, sob fluxo de ar seco e em banho-maria a 60 °C durante 10 minutos. O resíduo obtido foi reconstituído com 200 µL de fase metanol, com agitação em vórtex por 40 segundos. Injetou-se 20 µL da solução obtida em cromatógrafo.

5 Resultados e discussão

5.1 Análise do difosfato de cloroquina IFA por Polarimetria

Substâncias com a mesma estrutura contendo um ou mais centros quirais as quais são imagens especulares não superponíveis uma da outra são denominadas enantiômeros (FARMACOPEIA, 2010). Muitos fármacos possuem esta característica e são opticamente ativos por serem capazes de girar um plano incidente de luz polarizada, de modo que a luz transmitida emerge num ângulo mensurável em relação ao plano da luz incidente (THE UNITED STATES, 2016).

O polarímetro é um equipamento utilizado para determinar o ângulo de rotação óptica de luz polarizada passando por um material, a fim de distinguir os isômeros opticamente ativos. A substância capaz de girar a luz no sentido horário é distinguida com o sinal (+) sendo também denominada dextrorrotatória ou dextrógira, enquanto a substância que gira a luz plano polarizada no sentido anti-horário apresenta sinal (-) e a nomenclatura de levorrotatória ou levógira (THE UNITED STATES, 2016).

Quando uma amostra possui quantidades iguais dos enantiômeros é designada mistura racêmica, a qual não apresenta atividade óptica, isto é, não desvia o plano da luz polarizada, uma vez que as rotações para a direita (d-) e para a esquerda (l-) dos enantiômeros se compensam (MOSS, 1996).

O desvio no plano da luz polarizada encontrado após a leitura da solução amostra a 1% em água foi de $+0,03^\circ$.

O limite especificado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição para insumos farmacêuticos que são misturas racêmicas é de $- 0,1^\circ$ a $+ 0,1^\circ$. Deste modo, o insumo farmacêutico ativo analisado pode ser considerado uma mistura racêmica.

5.2 Determinação do peso médio dos comprimidos contendo cloroquina

Para a determinação de peso, 20 comprimidos foram pesados individualmente e calculado o peso médio. Os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 16**. Nenhuma unidade apresentou desvio em relação ao peso médio fora dos limites especificados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

Tabela 16: Valores dos pesos médios e variação em relação à média obtidos para cada lote analisado.

Lote	Peso médio (mg)	Valor máximo (mg)	Valor mínimo (mg)	Varição mínima (%)	Varição máxima (%)
1606EX088	417,54	422,82	413,18	-1,16	1,04
14050464	406,39	409,99	401,95	-0,89	1,09

5.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação e identificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimido

A enantiosseletividade da coluna Chirobiotic V é diferente em cada fase móvel devido às interações moleculares entre os grupos da fase estacionária e do analito, que funcionam mais intensamente na presença de alguns componentes da fase móvel (BEESLEY, LEE, 2007; ARMSTRONG *et al.*, 1994). Os dois modos de interação testados foram o polar iônico e o modo reverso.

Inicialmente, as análises foram realizadas no cromatógrafo Agilent 1100, no modo polar iônico. Este tipo de fase é preferível para moléculas básicas devido as vantagens das interações iônicas. É aplicável para todas as moléculas que possuem pelo menos um grupo ionizável perto ou no centro quiral e um grupo funcional em algum outro local na estrutura. (AHUJA, 2008; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

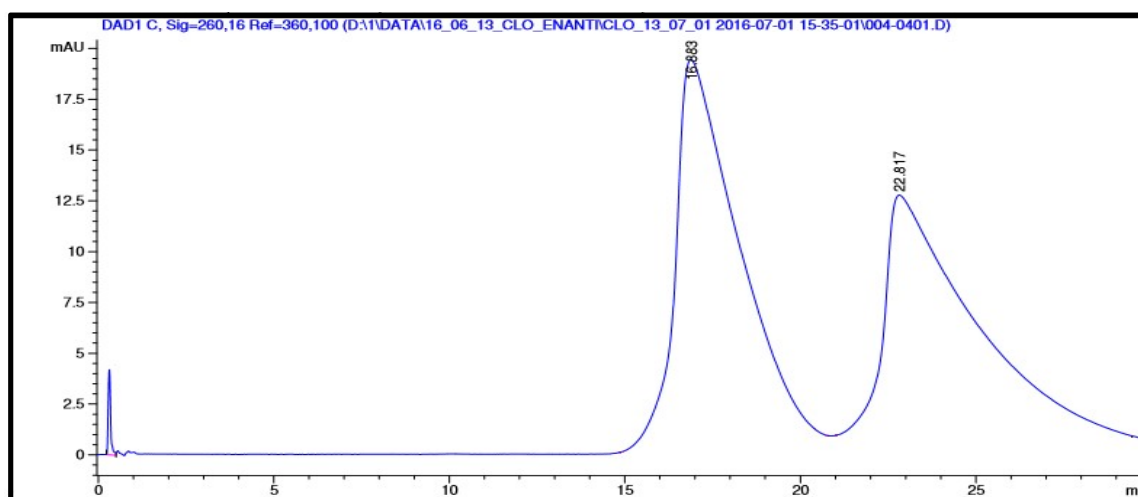
O modo polar iônico oferece a vantagem de alta seletividade, alta eficiência, baixa pressão, baixo tempo de análise e elevada vida útil da coluna. Este sistema de solvente orgânico anidro utiliza normalmente de metanol como veículo primário adicionado de pequenas quantidades de ácido e base, funcionando como mecanismo primário para manter as cargas adequadas tanto na FEQ como no composto ionizável (analito). Como a interação iônica é a chave para discriminação quiral neste sistema, a razão de ácido e base controlam tanto a seletividade quanto a retenção, pois mudanças na razão de ácido e base afetam o grau de carga em ambos glicopeptídeo macrocíclico e analito (BEESLEY, LEE, 2007; ARMSTRONG *et al.*, 1994).

Selecionou-se a fase móvel contendo metanol, ácido acético e trietilamina, conforme protocolo inicial de desenvolvimento. A fim de avaliar a enantioseparação da mistura racêmica de difosfato de cloroquina, foram utilizadas diferentes proporções de ácido e base, variando tanto a razão entre eles quanto a concentração em metanol. Utilizou-se para análise uma solução de difosfato de cloroquina em metanol na concentração 0,12 mg/mL. As condições cromatográficas iniciais foram: fluxo 1 mL/min, volume de injeção 10 µL, temperatura do forno 25 °C. Os principais resultados obtidos estão descritos na **Tabela 17**. Na **Figura 18**, está demonstradoo cromatograma obtido, referente à análise realizada com a fase móvel contendo MeOH: AA: TEA na proporção 100: 0,10: 0,8.

Tabela 17: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros de difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e trietilamina (TEA).

Composição da fase móvel			Enantiômero 1	Enantiômero 2	Resolução
MeOH: AA: TEA			Tr (min)	Tr (min)	
100	0,10	0,10	11,2	14,9	1,45
100	0,10	0,08	16,8	22,8	1,54
100	0,15	0,05	23,9	31,8	1,49
100	0,15	0,10	12,7	17,1	1,33
100	0,21	0,07	11,6	15,6	1,48
100	0,25	0,25	4,6	5,9	1,43
100	0,30	0,10	13,6	18,4	1,49
100	0,36	0,12	11,5	15,4	1,48
100	0,36	0,09	14,9	20,1	1,47

Figura 18: Cromatograma referente à análise realizada com a coluna Chirobiotic V e fase móvel contendo MeOH: AA: TEA na proporção 100: 0,10: 0,8.



Como é possível observar através dos dados apresentados na **Tabela 17**, ao se fixar a proporção entre ácido e base na fase móvel, a resolução manteve-se semelhante nas diversas condições. Dependendo das concentrações de ácido e base, os tempos de

retenção foram alterados. Em uma maior concentração de ácido/base em metanol, os analito eluíram primeiro, enquanto com uma menor concentração de ácido/base, os analitos ficaram mais retidos na coluna e eluíram com tempo de retenção maior.

Ao alterar a razão entre o ácido e a base, alterou-se também a enantioseparação, como é possível observar através das variações encontradas na resolução. Com uma maior acidez da fase móvel, os analitos ficaram mais retidos na fase estacionária, apresentando um maior tempo de retenção comparado com os valores obtidos ao se utilizar fases móveis com caráter mais básico.

Um componente ácido na fase móvel leva à protonação de analitos básicos. É necessário ajustar a concentração para que não se tenha mais ácido do que o necessário para protonar a molécula, do contrário ocorrerá redução na seletividade. Caso o analito seja eluído com tempo de retenção baixo, a concentração de ácido/base ou sal volátil deve ser reduzida. Do mesmo modo, caso o analito esteja muito retido na coluna, deve-se aumentar concentração de ácido/base ou sal volátil no solvente orgânico (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Para analitos básicos, normalmente a proporção maior do ácido leva a uma melhor separação, enquanto uma baixa separação é observada para maiores proporções de base. Em quantidades elevadas de ácido na fase móvel, o grupo amino presente na molécula de vancomicina encontra-se carregado positivamente e o grupo COOH mantém carga negativa suficiente e a seletividade obtida é ótima. Contudo, quando a fase móvel contém uma maior quantidade de base, o analito encontra-se no estado de base livre, fazendo com que as interações iônicas sejam muito fracas, apesar do grupo COOH da vancomicina encontrar-se totalmente desprotonado, levando a uma baixa retenção e seletividade (BEESLEY, LEE, 2007).

O metanol, utilizado como principal componente da fase móvel, possui grande capacidade de formar ligação de hidrogênio (BEESLEY, LEE, 2007), que é uma das principais interações entre a fase estacionária quiral e o analito. Ao se utilizar o metanol, este também interage com o seletor quiral, competindo com o analito. A

acetonitrila não possui grupo OH, de modo que não realiza ligações de hidrogênio com o seletor quiral. Portanto, o fenômeno observado neste modo de interação ao se utilizar os solventes metanol e acetonitrila é o oposto ao observado em cromatografia convencional no modo reverso. Deste modo, foi adicionado acetonitrila na fase móvel a fim de se avaliar este fenômeno e tentar melhorar a discriminação quiral dos enantiômeros. Para tanto foi avaliada a fase móvel contendo metanol: acetonitrila: ácido acético: trietilamina na proporção 90:10: 0,15:0,05. Os parâmetros obtidos estão demonstrados na **Tabela 18**.

Tabela 18: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros de difosfato de cloroquina em fase móvel contendo metanol: acetonitrila: ácido acético: trietilamina (90:10: 0,15:0,05) na coluna Chirobiotic V.

Composição da fase móvel				Enantiômero 1	Enantiômero 2	Resolução
MeOH: ACN: AA: TEA				Tr (min)	Tr (min)	
90	10	0,15	0,05	27,1	36,8	1,55

Os tempos de retenção obtidos nesta análise foram de 27,1 min e 36,8 min para os enantiômeros 1 e 2, respectivamente. Os tempos de retenção obtidos ao se utilizar a fase móvel com a composição metanol: ácido acético: trietilamina (100: 0,15:0,05) foram 23,9 min e 31,8 min. Pode-se observar que ao utilizar a acetonitrila na composição da fase móvel, os enantiômeros interagiram mais fortemente com o seletor quiral, eluindo com um tempo de retenção maior. Como não houve melhora significativa na resolução dos picos, o solvente orgânico selecionado para as análises foi metanol, por propiciar um tempo de corrida mais curto e menor gasto de solvente.

Em seguida, alterou-se a base da fase móvel de trietilamina para dietilamina ou hidróxido de amônio, mantendo-se o ácido acético e metanol. A dietilamina ($pK_b = 4,74$) e o hidróxido de amônio ($pK_b = 4,51$) possuem um caráter menos básico que a trietilamina ($pK_b = 3,28$) (SNYDER *et al.*, 1997).

Conforme observado na **Tabela 19**, ao se utilizar dietilamina, houve redução nos tempos de retenção em relação àqueles obtidos com a fase móvel contendo trietilamina nas mesmas concentrações. Entretanto, não houve melhora significativa na resolução entre os picos.

Tabela 19: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e dietilamina (DA).

Composição da fase móvel MeOH: AA: DA			Enantiômero 1 Tr (min)	Enantiômero 2 Tr (min)	Resolução
100	0,50	0,50	1,6	1,8	0,90
100	0,10	0,10	7,5	9,7	1,43
100	0,15	0,10	12,3	16,2	1,54

Os resultados obtidos com a fase móvel contendo hidróxido de amônio como base (**Tabela 20**) não apresentou diferenças significativas em relação às outras bases utilizadas. Os melhores parâmetros cromatográficos foram obtidos com a fase móvel contendo 0,50% de ácido acético e 0,20% de hidróxido de amônio.

Tabela 20: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e hidróxido de amônio.

Composição da fase móvel MeOH: AA: NH ₄ OH			Enantiômero 1 Tr (min)	Enantiômero 2 Tr (min)	Resolução
100	0,50	0,20	7,0	9,5	1,69
100	0,50	0,30	3,1	4,0	1,54
100	0,50	0,40	2,4	3,0	1,31

Muitos ácidos e bases podem ser utilizados na fase móvel, assim como sais voláteis. Particularmente para aplicação em LC-MS, trifluoroacetato de amônio e formiato de amônio são usados para análise de moléculas básicas (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004). A fim de se avaliar a enantiosseparação utilizando um sal volátil, preparou-se

uma fase móvel contendo formiato de amônio em metanol (%p/v). Os resultados estão apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol e formiato de amônio (FA).

Composição da fase móvel MeOH: FA		Enantiômero 1	Enantiômero 2	Resolução
		Tr (min)	Tr (min)	
100	0,05	12,4	16,7	1,70
100	0,1	7,1	19,3	1,67
100	0,2	4,7	15,8	1,59

Como não foi evidenciada melhora significativa na resolução entre os picos dos enantiômeros nas condições previamente testadas, a próxima etapa foi a utilização do modo reverso a fim de avaliar a enantiosseparação da mistura racêmica de difosfato de cloroquina, e comparar com os parâmetros obtidos no modo polar iônico.

Existem algumas razões pelas quais este modo pode ser mais efetivo para algumas moléculas básicas/ácidas. Como já foi relatado, quanto menor a distância das interações quirais para o centro quiral, maior a seletividade. Deste modo, caso o grupo do analito responsável pela interação esteja longe do centro, esta interação não será tão efetiva para a discriminação quiral. A vancomicina, após a adição de água, sofre alteração em sua conformação estrutural, favorecendo a formação de complexos de inclusão e permitindo com que os grupos aromáticos presentes na cavidade de inclusão ajudem a estabilizar a molécula do analito pela inclusão hidrofóbica. Tal fenômeno faz com que as outras interações mais distantes do centro quiral se tornem mais eficazes (AHUJA, 2008; BEESLEE, 2007; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Como a interação iônica também é muito importante no modo reverso, o pH da fase móvel possui impacto significativo na entiosseparação. Geralmente, compostos básicos são melhor separados em tampões com pH mais baixos (3-5), pois é neste pH em que os analitos e o seletor quiral estão apropriadamente ionizados e a interação é mais eficaz (BEESLEY, LEE, 2007). Sob essas condições, alterações no pH podem produzir

interações catiônicas ou aniônicas. O modo reverso favorece a formação de complexos de inclusão e as ligações de hidrogênio (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

O pH é o parâmetro mais importante para seletividade no modo reverso. A estabilidade do complexo fase estacionária/analito depende da carga do analito. Em geral, a seletividade aumenta com o aumento da formação do complexo. Deste modo, analitos básicos são melhor separados em valores de pH baixos, enquanto os ácidos preferem pH mais elevado, assumindo-se que o grupo ionizável esteja próximo ao centro quiral (BEESLEY, LEE, 2007; CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

A quantidade de modificador orgânico determina a retenção, enquanto o tipo de modificador, o tipo de tampão e o pH controlam a seletividade. Eficiência e seletividade também são afetadas pela força iônica, fluxo da fase móvel e temperatura de análise (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004).

Uma limitação do modo reverso é que a faixa de pH para o tampão aquoso deve estar entre 3,5 e 7,0 (CHIROBIOTIC HANDBOOK, 2004). Selecionou-se então a fase móvel contendo metanol e tampão acetato de amônio 20 mM em pH 5,0, em diferentes proporções, como condição analítica inicial. As demais condições cromatográficas e concentração do analito foram as mesmas utilizadas no modo polar iônico. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 22**.

Tabela 22: Parâmetros cromatográficos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol e tampão acetato de amônio 20 mM (pH 5,0).

Composição da fase móvel		Enantiômero 1	Enantiômero 2	Resolução
MeOH:	acetato de amônio 20 mM (pH 5,0)	Tr (min)	Tr (min)	
80	20	30,7	36,7	1,17
70	30	19,0	22,3	1,20
50	50	10,9	12,1	0,55
30	70	11,8	12,5	0,05

Na cromatografia convencional de fase reversa, com o aumento da proporção de água na fase móvel, ocorre um aumento da retenção dos analitos. Contudo, na cromatografia quiral de modo reverso, observou-se redução no tempo de retenção dos analitos com o aumento da concentração de tampão aquoso na fase móvel. Em comparação com o modo polar iônico, o modo reverso apresentou piores valores de resolução entre os enantiômeros.

A fim de otimizar a enantiosseletividade dos enantiômeros do difosfato de cloroquina, análises posteriores utilizando o modo polar iônico foram realizadas no cromatógrafo Thermo Finnigan Surveyor. A concentração da solução amostra foi reduzida para 0,06 mg/mL de difosfato de cloroquina em metanol. Utilizou-se fase móvel contendo metanol: ácido acético: trietilamina em três diferentes proporções, mantendo-se constante a razão entre ácido e base. As condições cromatográficas avaliadas foram: volume de injeção de 10 μ L, fluxo 0,5, 0,8 e 1 mL/min e temperatura da coluna 20, 25 e 30 °C. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 23**.

Tabela 23: Parâmetros cromatográficos obtidos para os enantiômeros difosfato de cloroquina em diferentes proporções de fase móvel contendo metanol, ácido acético (AA) e trietilamina (TEA).

Composição da fase móvel MEOH: AA: TEA	Fluxo (mL/min)	Temp. (°C)	Enantiômero 1			Enantiômero 2			Resolução
			Tr	N	S	Tr	N	S	
100:0,12:0,12	1	20°C	7,92	724	1,5	10,74	552	1,5	1,87
	1	25°C	7,7	867	1,4	10,5	715	1,9	2,12
	1	30°C	6,12	903	1,4	7,83	686	1,4	1,70
	0,5	30°C	12,08	1217	1,7	15,48	835	1,7	1,93
	0,8	30°C	7,62	1010	1,5	9,75	738	1,5	1,78
100:0,14:0,14	1	25°C	8,0	784	2,8	10,65	598	2,8	1,84
	1	30°C	7,04	893	1,6	9,13	671	1,6	1,77
	0,8	25°C	10,04	872	1,7	13,37	647	1,7	1,92
	0,8	30°C	8,84	994	1,7	11,47	727	1,7	1,86
	0,5	25°C	16,14	1032	1,8	21,50	744	1,8	2,08
	0,5	30°C	13,97	1179	1,8	18,14	823	1,8	2,01
100:0,13:0,12	1	30°C	12,15	920	1,9	15,99	632	1,9	1,85
	1	35°C	10,55	986	1,9	13,52	699	1,9	1,74

N = número de pratos teóricos

S = assimetria

A resolução avalia a distância entre dois picos adjacentes em um cromatograma, sendo um parâmetro crítico para uma análise cromatográfica. Como a separação de dois picos pode ser influenciada por diversos fatores, a resolução também pode ser determinada em função destes parâmetros, que estão diretamente relacionados às condições experimentais, conforme fórmula (SNYDER *et al.*, 1997):

$$R_s = 1/4 (\alpha - 1) N^{1/2} \frac{k}{1 + k}$$

Em que: k = fator de capacidade ou fator de retenção

α = fator de separação

N = número de pratos teóricos

Existem vários fatores que podem influenciar k e α , como composição da fase móvel, tipo da fase estacionária e temperatura. A fase estacionária foi selecionada pelos fatores previamente mencionados e a fase móvel foi avaliada em diferentes composições e proporções de solventes. Deste modo, a temperatura foi alterada a fim de avaliar seu impacto na resolução entre os picos (SNYDER *et al.*, 1997).

O número de pratos teóricos é influenciado principalmente por fatores relacionados à fase estacionária e ao fluxo da fase móvel. Deste modo, o fluxo foi alterado a fim de avaliar seu impacto na resolução entre os picos.

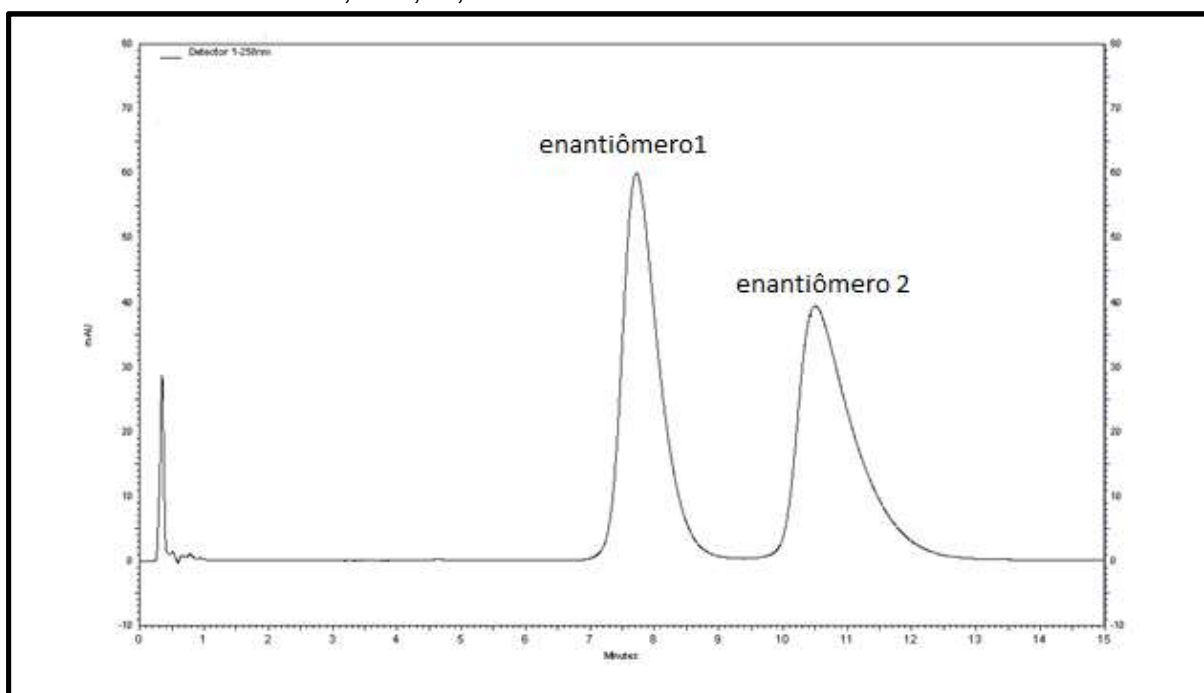
Um fenômeno geral observado para essa FEQ é que a redução do fluxo leva a um aumento da resolução, favorecendo as separações que ocorrem nos modos reverso e polar iônico. A alteração na temperatura tem efeito na maioria das interações intermoleculares responsáveis pela enantioseparação. A redução da temperatura atenua as interações fracas resultando em uma melhor enantioseparação, enquanto o aumento da temperatura reduz a resolução entre os picos (BEESLEY, LEE, 2007).

O parâmetro principal para escolha da melhor condição foi a resolução. Avaliou-se também a condição que possui uma simetria menor que 2 com um número de pratos teóricos maior possível dentro destas condições estipuladas. Deste modo, foi selecionada a fase móvel composta por metanol: ácido acético e trietilamina na proporção 100:0,12:0,12, em um fluxo de 1 mL/min e 25 °C, pois promoveu a adequada separação dos picos em um tempo de corrida de 15 minutos, que é considerado um

tempo adequado para este tipo de separação. O cromatograma obtido está representado na **Figura 19**.

Malhães e Bonato realizaram a separação dos enantiômeros de cloroquina utilizando a coluna cromatográfica Chirobiotic V no modo polar iônico, na fase móvel contendo metanol: acetonitrila: ácido acético: dietilamina (90:10:0,5:0,5) e identificaram o enantiômero 1 como (-)-R-Cloroquina e o enantiômero 2 como (+)-S-Cloroquina. No presente estudo, não foi possível confirmar a identidade dos enantiômeros, devido à necessidade de cromatografia semi-preparativa. Deste modo, como foi utilizado a mesma coluna e o mesmo modo polar iônico, propõe-se que o enantiômero 1 e 2 sejam (-)-R-Cloroquina e (+)-S-Cloroquina, respectivamente.

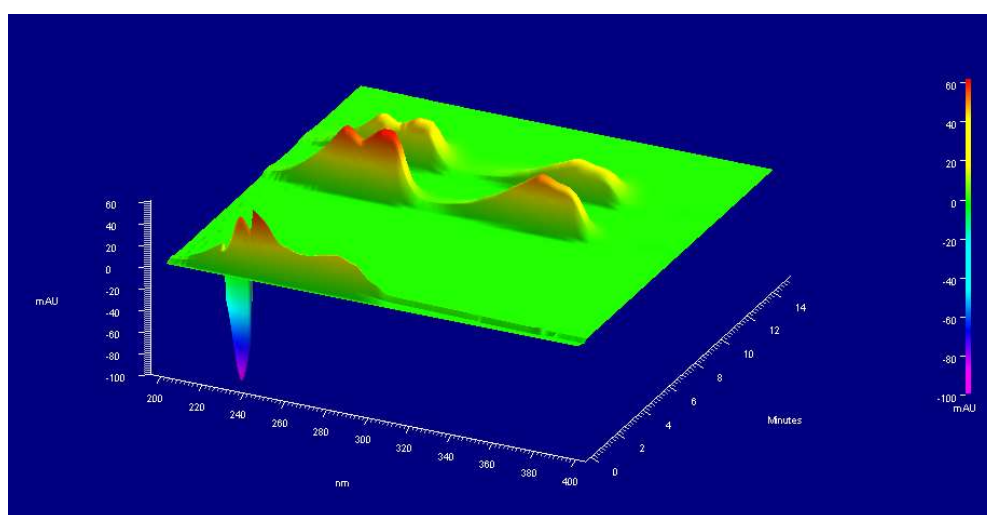
Figura 19: Cromatograma referente aos enantiômeros do difosfato de cloroquina obtido com a fase móvel contendo metanol: ácido acético e trietilamina na proporção 100:0,12:0,12, em um fluxo de 1 mL/min e 25 °C.



Para determinar o comprimento de onda ótimo de detecção, os espectros de absorção na região do ultravioleta dos enantiômeros da cloroquina foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm (**Figura 20**). Os valores de comprimentos de onda máximos encontrados

foram de 258 e 239 nm. Foi selecionado o comprimento de onda e 258 nm por apresentar máxima absorção para os enantiômeros.

Figura 20: Espectro de absorção na região do ultravioleta obtido em DAD (200 a 400 nm) da solução de difosfato de cloroquina na concentração 60 $\mu\text{L/mL}$ em fase móvel metanol: ácido acético e trietilamina (100:0,12:0,12).



As condições analíticas definidas após desenvolvimento do método estão descritas na **Tabela 24**.

Tabela 24: Condições analíticas estabelecidas para determinação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina em comprimidos por CLAE-UV.

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Chirobiotic V (100 x 2,1 mm; 5 μm)
Fase Móvel	MeOH: AA: TEA (100:0,12:0,12)
Fluxo	1 mL/min
Temperatura da coluna	25 °C
Detecção	258 nm
Volume de injeção	10 μL
Tempo de corrida	15 minutos
Concentração da solução de trabalho	60 $\mu\text{L/mL}$ (30 $\mu\text{L/mL}$ para cada enantiômero do difosfato de cloroquina)

5.4 Validação do método analítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos

Seletividade

Os cromatogramas obtidos através das análises da solução diluente, placebo e fase móvel demonstraram que nenhum interferente eluiu nos tempos de retenção dos picos de interesse.

A determinação da pureza espectral dos picos cromatográficos dos enantiômeros foi realizada com auxílio do detector de arranjo de diodos. As purezas dos picos referentes aos enantiômeros obtidas com as soluções padrão e amostra foram 99,99 para ambos os enantiômeros. Os altos valores de pureza de pico encontrados indicam que outros compostos não coeluíram nos mesmos tempos de retenção dos picos de interesse.

A seletividade também foi avaliada ao submeter o fármaco a condições de estresse por hidrólise ácida e básica, exposição à luz UV, calor seco e por oxidação. A porcentagem de degradação dos fármacos e a pureza dos picos dos enantiômeros estão relatadas na **Tabela 25**. Todas as purezas dos picos encontradas foram superiores a 99%, o que confirma a seletividade do método.

Tabela 25: Resultados encontrados após as amostras de difosfato de cloroquina serem submetidas a condições de estresse.

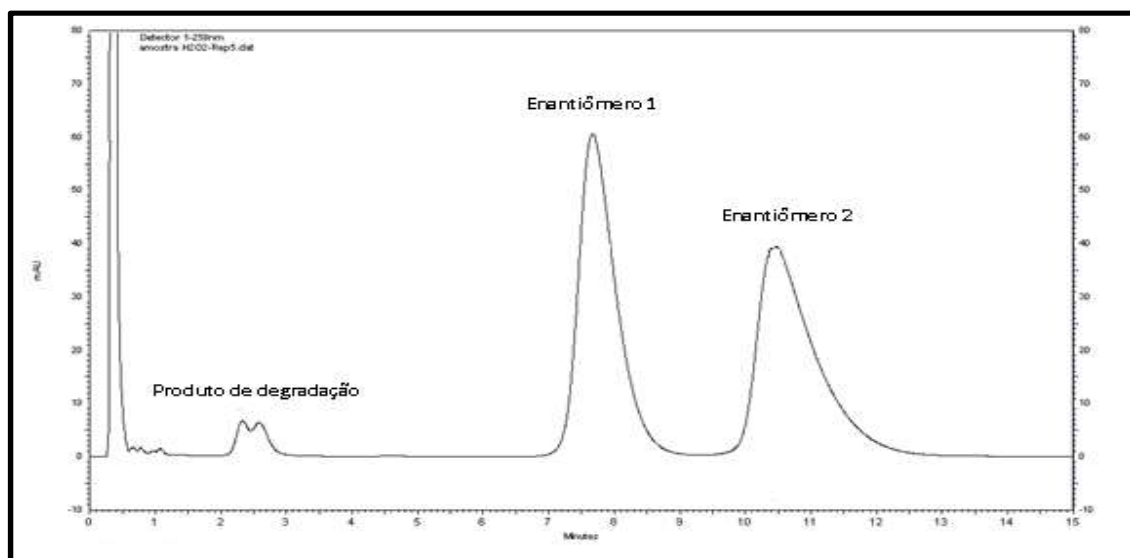
Condição	Enantiômero 1		Enantiômero 2	
	% de degradação	pureza do pico (%)	% de degradação	pureza do pico (%)
<i>Hidrólise ácida - 72 horas</i>	n.s.*	99,99	n.s.*	99,99
<i>Hidrólise básica - 72 horas</i>	19,62	99,99	19,64	99,99
<i>Oxidação - 72 horas</i>	2,38	99,99	2,30	99,99
<i>Exposição ao calor seco: estufa a 115 °C - 72 horas</i>	n.s.*	99,99	n.s.*	99,99
<i>Exposição à radiação UV - 72 horas</i>	n.s.*	99,99	n.s.*	99,99

*n.s. = não significativo.

O difosfato de cloroquina se mostrou estável quando exposto à hidrólise ácida, ao calor seco a 115 °C e à radiação UV. O fármaco apresentou uma degradação significativa após a exposição em meio básico e oxidativo. Esses resultados são similares aos relatados por COELHO (2016).

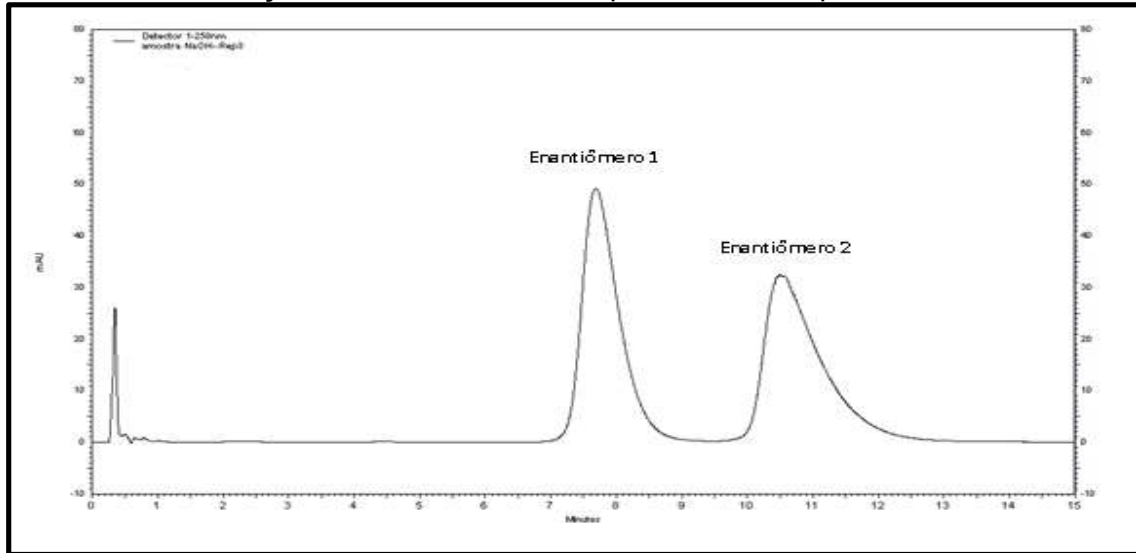
O cromatograma apresentado na **Figura 21** foi obtido após a oxidação do difosfato de cloroquina por H₂O₂ 3%. Um produto de degradação foi observado no tempo de retenção de 2,32 min. É possível inferir que pela análise do formato dos picos deste produto de degradação, que apesar de não estarem separados no nível de linha de base, possivelmente correspondem à degradação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina e também são substâncias quirais

Figura 21: Cromatograma obtido após a oxidação do difosfato de cloroquina nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.



O cromatograma apresentado na **Figura 22** foi obtido após a hidrólise básica do difosfato de cloroquina por NaOH 1 M. A degradação desse fármaco foi de 19,6% e não foi verificado nenhum pico de degradação no cromatograma. Isso indica que os produtos de degradação formados podem não ter um grupo cromóforo e, dessa forma, não absorver radiação no comprimento de onda selecionado para análise (258 nm). Outra alternativa é que os produtos formados sejam voláteis.

Figura 22: Cromatograma obtido após a hidrólise básica de difosfato de cloroquina nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.



Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas analíticas construídas com os valores de concentração dos enantiômeros do difosfato de cloroquina na faixa de 80% a 120% da concentração de trabalho e seus respectivos valores de área dos picos. Os dados estão descritos nas **Tabelas 26 e 27**.

Tabela 26: Concentrações do enantiômero 1 do difosfato de cloroquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.

Replicata	Nível de concentração*	Concentração (µg/mL)	Área
1	80%	24,0634	1921945
	90%	27,0713	2160037
	100%	30,0792	2406836
	110%	33,0871	2633664**
	120%	36,0950	2877250**
2	80%	24,1430	1930867
	90%	27,1609	2171522
	100%	30,1788	2416718
	110%	33,1967	2649061
	120%	36,2146	2886625
3	80%	24,1430	1925231
	90%	27,1609	2167214
	100%	30,1788	2417495
	110%	33,1967	2656174
	120%	36,2146	2897031

*Em relação à concentração de trabalho.

***Outlier*

Tabela 27: Concentrações do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.

Replicata	Nível de concentração*	Concentração (µg/mL)	Área
1	80%	24,0634	1919372
	90%	27,0713	2158036
	100%	30,0792	2400446
	110%	33,0871	2629881**
	120%	36,0950	2872835**
2	80%	24,1430	1925139
	90%	27,1609	2166260
	100%	30,1788	2412790
	110%	33,1967	2644135
	120%	36,2146	2884407
3	80%	24,1430	1923600
	90%	27,1609	2162228
	100%	30,1788	2411999
	110%	33,1967	2648857
	120%	36,2146	2893689

*Em relação à concentração de trabalho.

***Outlier*

Após a aplicação dos testes estatísticos, detectou-se dois *outliers*, que foram excluídos do conjunto de dados, e concluiu-se que os resíduos atenderam a todas as premissas necessárias para utilização dos métodos dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), conforme mostrado na **Tabela 28** para o enantiômero 1 e **Tabela 29** para o enantiômero 2 do difosfato de cloroquina.

Tabela 28: Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO referente ao enantiômero 1 do difosfato de cloroquina.

Premissa	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de outliers pelo método Jackknife	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Apenas dois pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de dois pontos considerados <i>outliers</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9796$ $R_{crítico} = 0,9315$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson	$d_u < d_{calculado} < 4 - d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,33945$ $d_{cal} = 2,56543$ $4 - d_u = 2,66046$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 0,0467$ $t_{crítico} = 2,201$	Há homoscedasticidade entre os resíduos.

Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007.

Tabela 29: Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO referente ao enantiômero 2 do difosfato de cloroquina.

Premissa	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de outliers pelo método Jackknife	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Apenas dois pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de dois pontos considerados <i>outliers</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9787$ $R_{crítico} = 0,9315$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson	$d_u < d_{calculado} < 4 - d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,33945$ $d_{cal} = 2,45955$ $4 - d_u = 2,66055$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 0,0224$ $t_{crítico} = 2,201$	Há homoscedasticidade entre os resíduos.

Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007.

Diante dos resultados satisfatórios em relação às premissas, aplicou-se o MMQO aos dados das **Tabelas 28 e 29**, possibilitando a avaliação da associação linear entre as variáveis: coeficiente linear, coeficiente angular, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (R^2), descritos nas **Figuras 23 e 24** para os enantiômeros 1 e 2 do difosfato de cloroquina respectivamente. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,98 conforme requerido pela RE n.º 899 (2003).

Figura 23: Curva analítica para avaliação da linearidade do método para o enantiômero 1 do difosfato de cloroquina na faixa de 24 a 36 µg/mL.

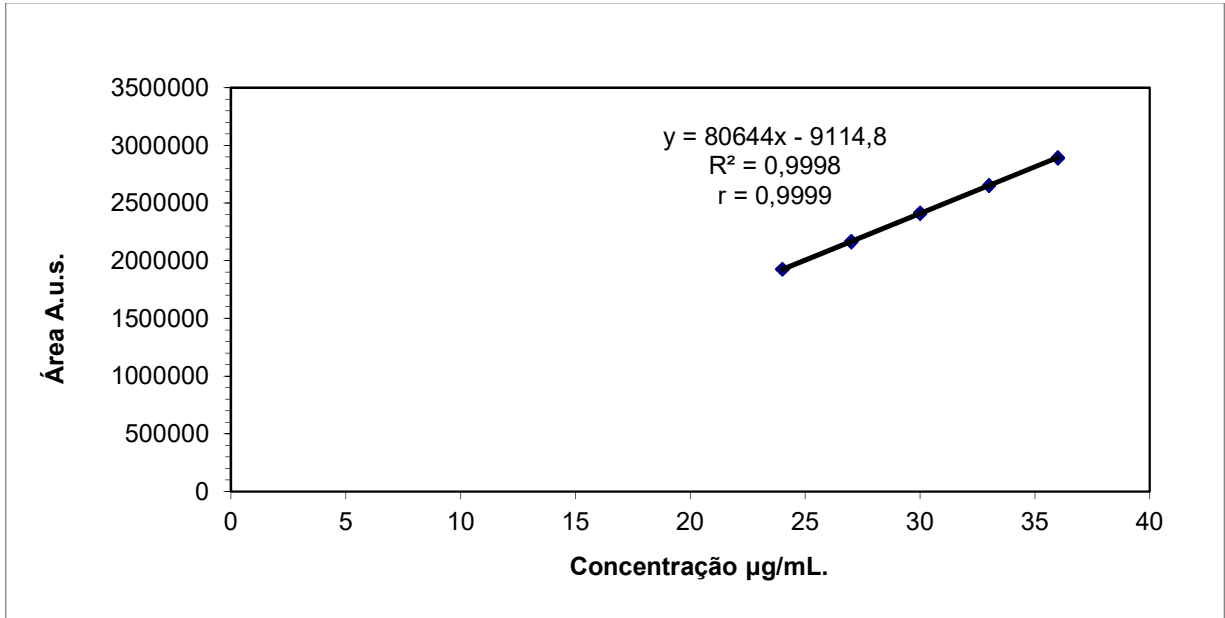
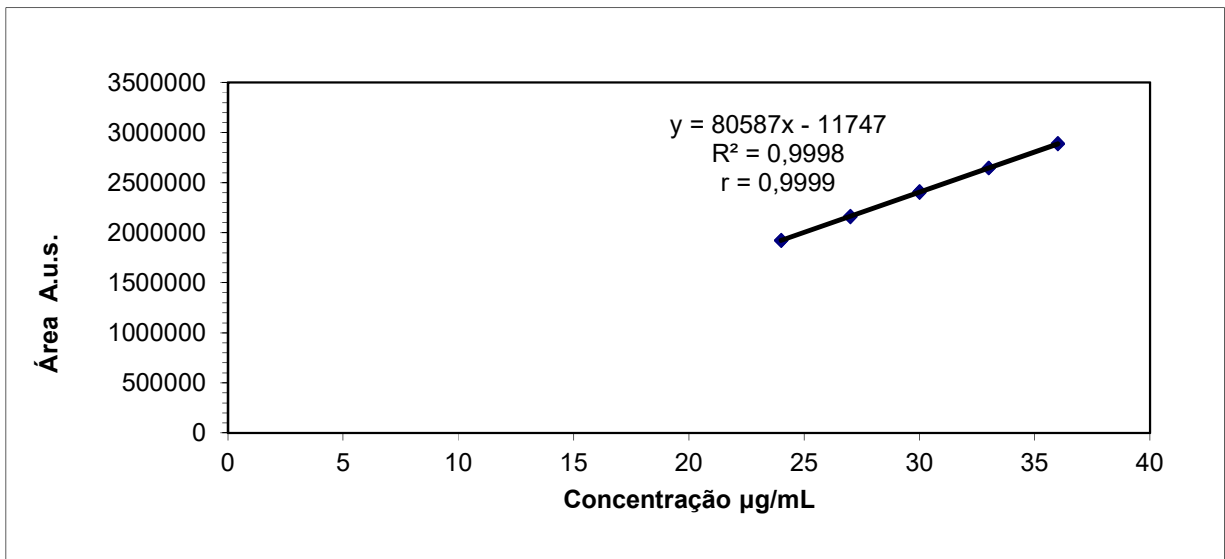


Figura 24: Curva analítica para avaliação da linearidade do método para o enantiômero 2 do difosfato de cloroquina na faixa de 24 a 36 µg/mL.



Em um gráfico de dispersão, foram plotados os dados de concentração do fármaco versus resíduos a fim de realizar a avaliação visual da distribuição dos resíduos. Os pontos no gráfico de resíduos se apresentaram aleatoriamente distribuídos ao redor do

eixo x, não apresentando comportamento ou tendência funcional. Os gráficos estão dispostos nas **Figuras 25 e 26**.

Figura 25: Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do enantiômero 1 difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.

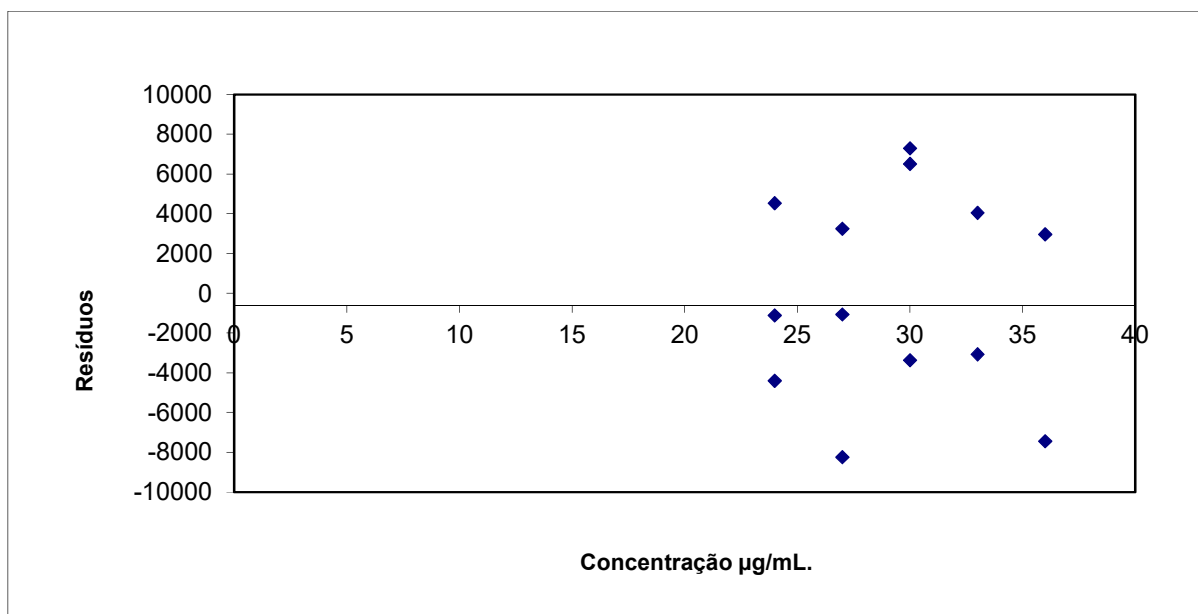
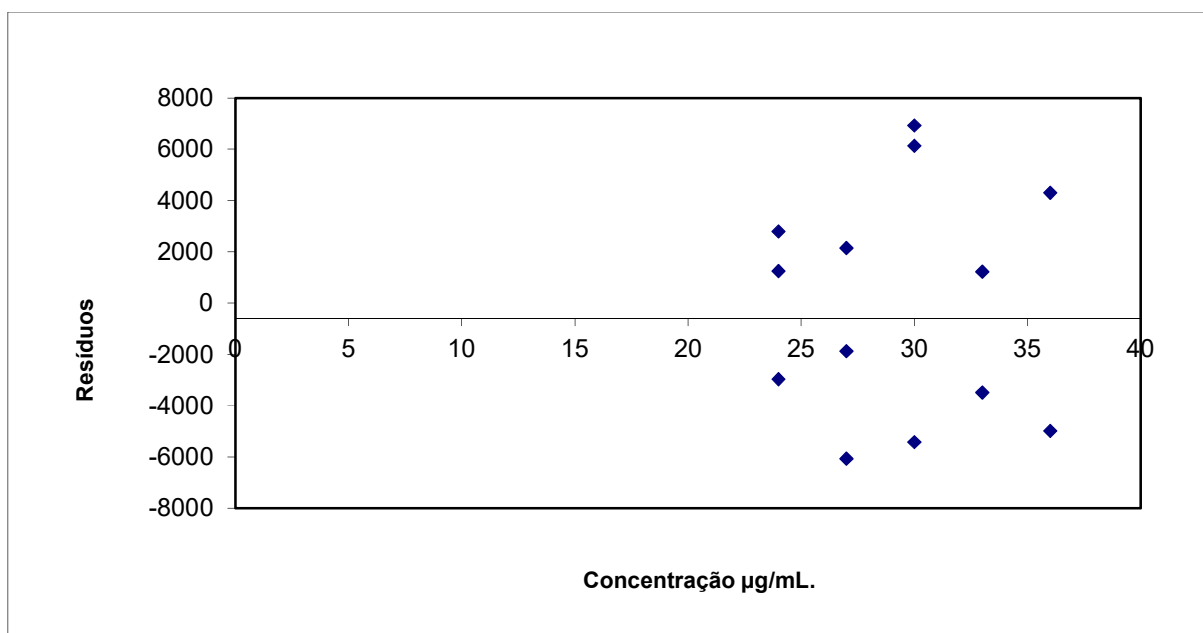


Figura 26: Gráfico exploratório dos resíduos da regressão do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.



Os coeficientes de determinação obtidos para o enantiômeros 1 e 2 foram próximos de 1 (0,9998), sendo os coeficientes de correlação maiores do que 0,99 (0,9999). Estes valores estão de acordo com o preconizado pela Resolução RE nº 899 (2003) (ANVISA), na qual é descrito que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação (r) maior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003b).

Contudo, de acordo com Thompson e colaboradores (2002), o coeficiente de correlação é inadequado para indicar a falta de ajuste ao modelo linear, não devendo ser utilizado como único teste para avaliar a linearidade (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002). Os coeficientes de correlação e de determinação indicam o grau de ajuste dos dados à curva, independente do modelo. Contudo, valores de R^2 próximos a 1 não indicam necessariamente uma relação linear, podendo resultar de pontos bem ajustados a um modelo não linear (SOUZA, 2007).

Deste modo, realizou-se a análise da variância (ANOVA) a fim de avaliar a significância da regressão e desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 5% e que não há desvio de linearidade ($p > 0,05$), ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa analisada (80% a 120% da concentração de trabalho).

Precisão

A avaliação da precisão intra-corrida e inter-corridas foi realizada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) dos valores encontrados para os enantiômeros do difosfato de cloroquina, em uma amostra homogênea de comprimidos. Os resultados da precisão para o os enantiômeros 1 e 2 estão relacionados na **Tabela 30 e 31**, respectivamente.

Tabela 30: Valores de área e teor do enantiômero 1 do difosfato de cloroquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	<i>1º dia Área</i>	<i>Teor (%)</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	<i>2º dia Área</i>	<i>Teor (%)</i>
1	29,9183	2371522	98,57	29,9183	2434646	99,21
2	29,9239	2342703	97,35	30,1128	2424578	98,16
3	29,9239	2372599	98,60	29,8905	2442776	99,64
4	29,9517	2357183	97,86	29,9017	2456998	100,18
5	29,9572	2345157	97,35	30,0072	2421973	98,40
6	30,0183	2432642	100,77	29,9572	2426704	98,76
	Média (n = 6)		98,42		Média (n = 6)	99,03
	DPR (%)		1,30		DPR (%)	0,77
Média (n = 12) = 98,74						
DPR (%) = 1,07						

Tabela 31: Valores de área e teor do enantiômero 2 do difosfato de cloroquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	<i>1º dia Área</i>	<i>Teor (%)</i>	<i>Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	<i>2º dia Área</i>	<i>Teor (%)</i>
1	29,9183	2361502	98,42	29,9183	2429786	99,15
2	29,9239	2334313	97,27	30,1128	2423007	98,24
3	29,9239	2369406	98,73	29,8905	2439146	99,62
4	29,9517	2347608	97,73	29,9017	2453104	100,16
5	29,9572	2337322	97,29	30,0072	2413300	97,75
6	30,0183	2425475	100,75	29,9572	2421148	98,61
	Média (n = 6)		98,37		Média (n = 6)	98,92
	DPR (%)		1,33		DPR (%)	0,91
Média (n = 12) = 98,64						
DPR (%) = 1,12						

Para o enantiômero 1 do difosfato de cloroquina, a média dos teores obtidos nos dois dias consecutivos (n = 12) foi de 98,74% e o DPR foi de 1,07% enquanto para o enantiômero 2 a média dos teores obtidos nos dois dias consecutivos (n = 12) foi de 98,64% e o DPR foi de 1,12%. Estes valores estão de acordo com a RE n.º 899 (2003), que determina o valor máximo aceitável do DPR de 5%, e também com a literatura como valor máximo aceitável do DPR de 2% (RIBANI *et al.*, 2004).

Na comparação dos resultados de teor obtidos nos dois dias consecutivos, os valores de t calculado foram de -1,054 e -0,856 para os enantiômeros 1 e 2 do difosfato de cloroquina, sendo maior que o valor de $-t$ crítico (-2,228) e menor que o valor de t crítico de 2,228. Com base nestes dados, é demonstrado que a variância da Repetibilidade e precessão intermediária são semelhantes ao nível de significância de 5%, indicando portanto, que não houve diferença significativa entre as médias dos teores.

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado. As amostras foram quantificadas e as taxas de recuperação obtidas nos níveis 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho estão reportadas na **Tabela 32**.

Tabela 32: Valores de recuperação obtidos para enantiômeros 1 e 2 do difosfato de cloroquina.

Nível (%)	Recuperação enantiômero 1 (%)	Recuperação enantiômero 2 (%)
80	100,32	100,22
80	100,18	100,16
80	99,21	99,26
100	100,85	100,83
100	99,97	99,96
100	99,83	99,86
120	100,84	100,80
120	99,83	99,60
120	99,23	98,80
Média (%)	100,03	99,94
DPR (%)	0,58	0,65

Os valores de porcentagem de recuperação próximos a 100% e desvio padrão relativo abaixo de 2,0% indicam que o método apresenta exatidão adequada para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos.

Limite de detecção e quantificação

Os LD e LQ estimados a partir das equações que levam em consideração os parâmetros da curva analítica foram 0,84 $\mu\text{g/mL}$ e 2,80 $\mu\text{g/mL}$ para enantiômero 1 e

0,70 µg/mL e 2,30 µg/mL para o enantiômero 2, respectivamente. Estes valores foram inferiores às concentrações das soluções utilizadas na validação do método e demonstram sensibilidade adequada do método analítico para a aplicação pretendida.

Robustez

Para a avaliação da robustez foram variados os parâmetros: fluxo da fase móvel, temperatura do forno do cromatógrafo, tempo de agitação no ultrassom e estabilidade da solução de trabalho. Os resultados obtidos estão sumarizados na **Tabela 33**.

Tabela 33: Resultados da influência dos efeitos no teor e tempo de retenção dos enantiômeros do difosfato de cloroquina obtidos durante a avaliação da robustez por CLAE.

Condição	Enantiômero 1		Enantiômero 2	
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
Nominal	98,57	-	98,42	-
Fluxo da FM (-) 0,9 mL/min	98,27	0,22	98,14	0,20
Fluxo FM (+) 1,1 mL/min	97,96	0,44	97,83	0,43
Temperatura do forno (-) 23°C	98,69	0,09	98,76	0,24
Temperatura do forno (+) 27°C	98,39	0,13	98,45	0,02
Tempo de agitação no ultrassom (+) 20 min	98,46	0,08	98,46	0,03
Estabilidade pós 24 horas	98,80	0,16	98,94	0,38

Não foram observadas mudanças significativas na área dos picos dos enantiômeros do difosfato de cloroquina nos cromatogramas obtidos. Picos adicionais, correspondentes a produtos de degradação, também não foram observados nos cromatogramas.

A comparação do DPR não demonstrou diferença significativa entre o resultado obtido na condição nominal e os resultados obtidos em cada uma das condições avaliadas.

Na comparação dos resultados de teor obtidos entre o valor nominal e após a variação dos parâmetros, os valores de t calculados foram inferiores ao t crítico em todas as condições, indicando, portanto, que não houve diferença significativa entre as médias dos teores ao nível de significância de 5%, e que o método analítico proposto apresenta robustez adequada.

5.5 Quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos

Os resultados médios de teor dos enantiômeros do difosfato de cloroquina nas amostras de comprimidos obtidos pelo método desenvolvido e validado estão relacionados na **Tabela 34**.

Tabela 34: Resultados médios da determinação de teor dos enantiômeros do difosfato de cloroquina nas amostras de comprimidos.

Lote	Enantiômero 1		Enantiômero 2		Mistura racêmica
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)
1606EX088	49,91	0,39	49,85	0,38	99,76
15050464	49,59	0,06	49,52	0,01	99,11

Conforme observado na **Tabela 34**, os comprimidos de difosfato de cloroquina, quanto ao teor, podem ser considerados de qualidade satisfatória. O teor do fármaco se manteve dentro da faixa de 93,0 a 107,0% do valor rotulado, conforme especificado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010). Também é possível afirmar que o difosfato de cloroquina presente nos comprimidos trata-se de uma mistura racêmica, por possuir quantidades semelhantes dos enantiômeros 1 e 2.

5.6 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos enantiômeros do difosfato de cloroquina utilizando coluna tipo polissacarídeos

O exato mecanismo de reconhecimento quiral de FEQs baseadas em polissacarídeos ainda não está bem estabelecido, contudo propostas quanto à formação de complexos soluto-seletor quiral através de inclusão dos enantiômeros na cavidade quiral das FEQs foi documentada (SHEN, OKAMOTO, 2016; LORENZ, SEIDEL-MORGENSTERN, 2014) Interações não específicas controlam a retenção do enantiômero, enquanto interações estereoespecíficas controlam a separação (CIRILLI *et al.*, 2004; WANG, WENSLOW, 2003; OKAMOTO, YASHIMA, 1998).

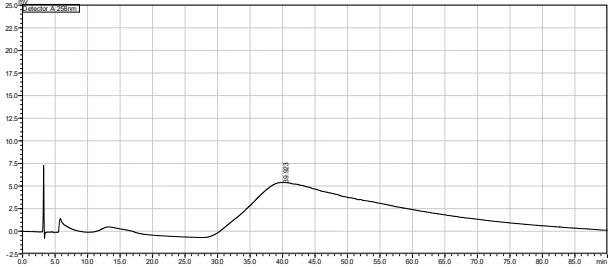
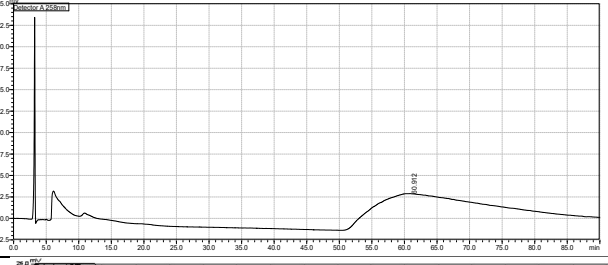
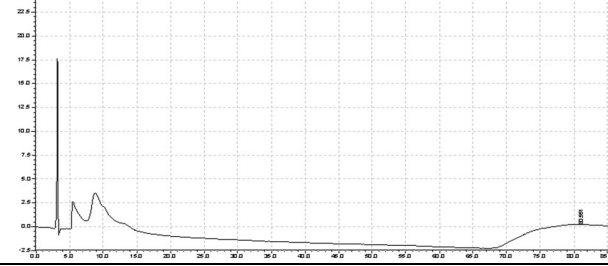
O complexo soluto-FEQ é formado basicamente por interações moleculares não covalentes como interação de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações π - π (EL-BEHAIRY, EL-AZZOUNY, 2016; ABOUL-ENEIN, 2002; OKAMOTO, YASHIMA, 1998).

A configuração molecular do polissacarídeo formado por amilose apresenta uma conformação helicoidal, onde o grupo polar carbamato está posicionado internamente, enquanto os grupos aromáticos hidrofóbicos estão localizados na parte externa na cadeia polimérica (EL-BEHAIRY, EL-AZZOUNY, 2016; WINGER *et al.*, 2009).

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo Shimadzu XFLC com detector DAD. As condições cromatográficas iniciais foram: coluna Chiralpak ID (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fluxo 1mL/min, volume de injeção 5 μ L, temperatura da coluna 25 °C e concentração da solução de difosfato de cloroquina 0,1 mg/mL em metanol.

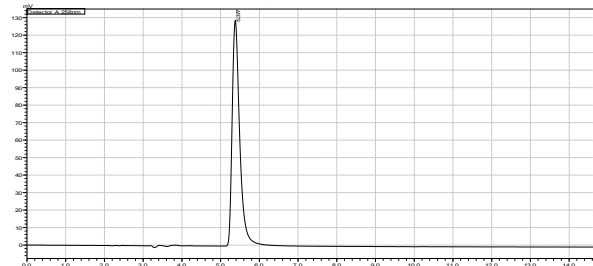
Avaliou-se a enantiosseletividade da fase estacionária para o difosfato de cloroquina no modo reverso, em diferentes composições de fase móvel. Os cromatogramas obtidos e os parâmetros cromatográficos (tempo de retenção - T_r , assimetria - S e resolução - R) estão dispostos na **Tabela 35**.

Tabela 35: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina no modo reverso, na coluna Chiralpak ID.

Fase Móvel	Enantiômero 1		Enantiômero 2		R	Cromatograma
	Tr (min)	S	Tr (min)	S		
metanol:água 50:50	39,3	2,5	-	-	-	
metanol:água 40:60	60,9	-	-	-	-	
metanol:água 30:70	80,5	-	-	-	-	

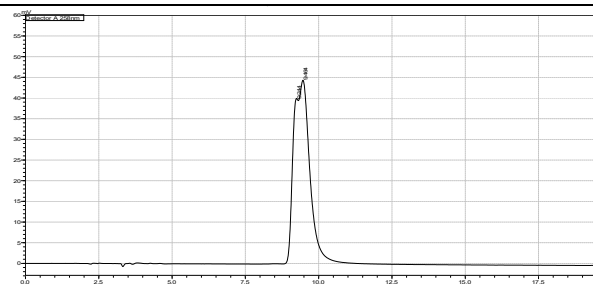
metanol:água:
triethylamina
90:10:0,1

5,3 1,4 - - -



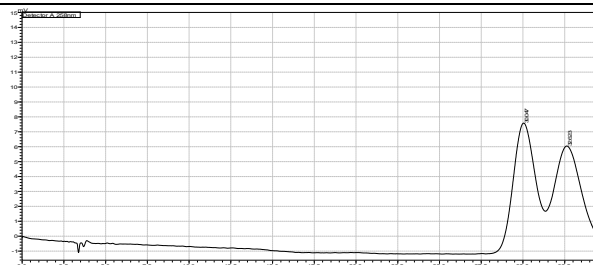
metanol:água:
triethylamina
80:20:0,1

9,2 - 9,5 - 0,07



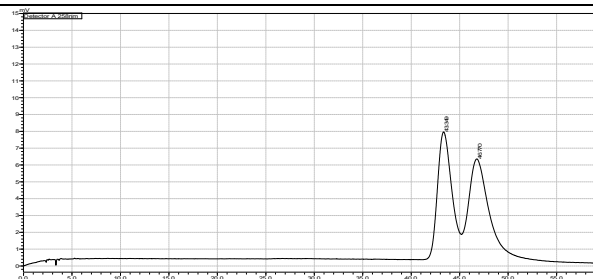
metanol:água:
triethylamina
70:30:0,1

30,0 - 32,6 - 0,9



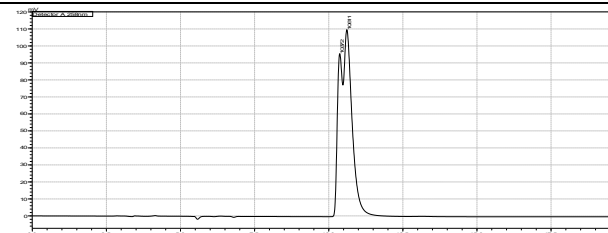
metanol:água:
triethylamina
65:35:0,1

43,3 - 46,8 - 1,0



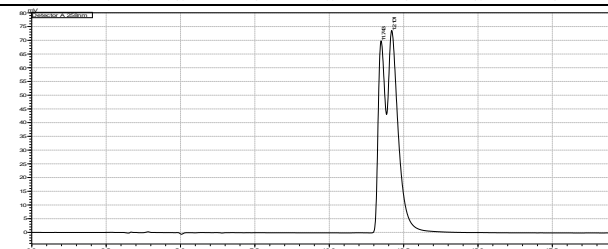
acetonitrila:
água:
triethylamina
90:10:0,1

10,3 - 10,6 - 0,4



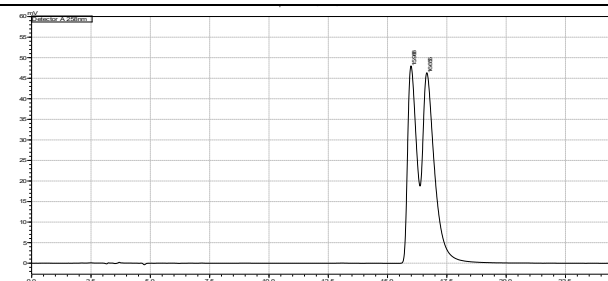
acetonitrila:
água:
triethylamina
80:20:0,1

11,7 - 12,1 - 0,6



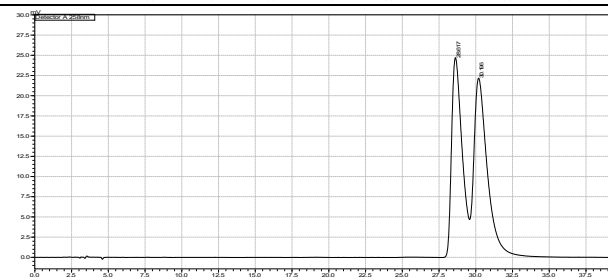
acetonitrila:
água:
triethylamina
70:30:0,1

15,9 - 16,7 - 0,8



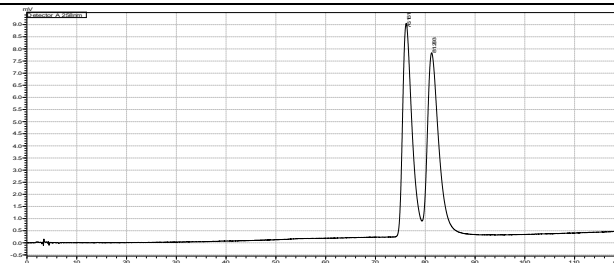
acetonitrila:
água:
triethylamina
60:40:0,1

28,6 - 30,2 - 1,1



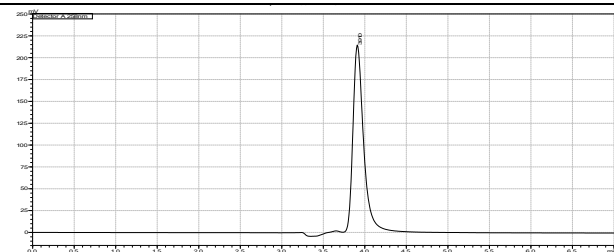
acetonitrila:
água:
trietilamina
50:50:0,1

76,2 1,6 81,3 1,5 1,4



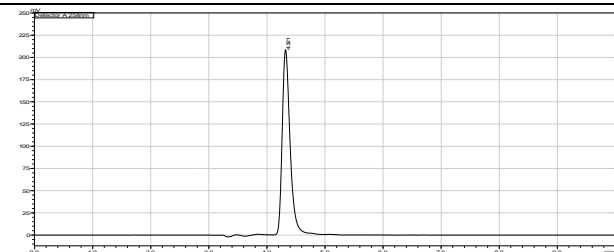
etanol: água:
trietilamina
100:0:0,1

3,9 1,6 - - -



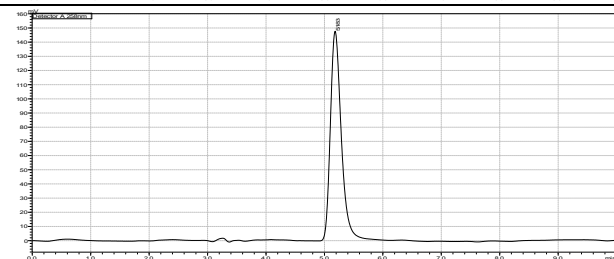
etanol: água:
trietilamina
90:10:0,1

4,3 1,4 - - -



etanol: água:
trietilamina
80:20:0,1

5,2 1,3 - - -



etanol: água:
trietilamina
70:30:0,1

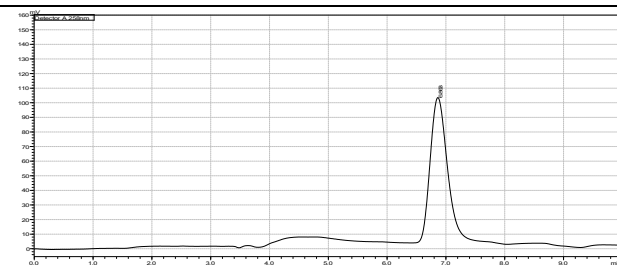
6,9

1,3

-

-

-



Inicialmente, avaliou-se a fase móvel contendo metanol e água em diversas proporções, contudo nenhuma das proporções avaliadas levou a enantioseparação do composto, gerando apenas um pico. É possível observar que uma menor proporção de metanol na fase móvel levou a uma maior retenção do pico.

Posteriormente, foi adicionado 0,1% de trietilamina na fase móvel, sendo possível observar a presença de dois picos no cromatograma, correspondentes aos enantiômeros 1 e 2 do difosfato de cloroquina. Para a fase móvel contendo metanol, água e trietilamina, a melhor proporção obtida foi de 65:35:0,1. Apesar de ser possível observar a presença de dois picos no cromatograma, a resolução encontrada foi de 1,0 e os tempos de retenção obtidos foram relativamente altos sendo de 43,3 e 46,8 min para os enantiômeros 1 e 2, respectivamente.

O objetivo da trietilamina na fase móvel é diminuir o efeito das interações do analito com os grupos silanois residuais. Por se tratar de um reagente de caráter básico, a trietilamina interage com os grupos silanois que possuem caráter ácido, reduzindo a retenção da cloroquina nestes grupos. Assim, a cloroquina fica mais livre para interagir com o seletor quiral (SNYDER *et al.*, 1997).

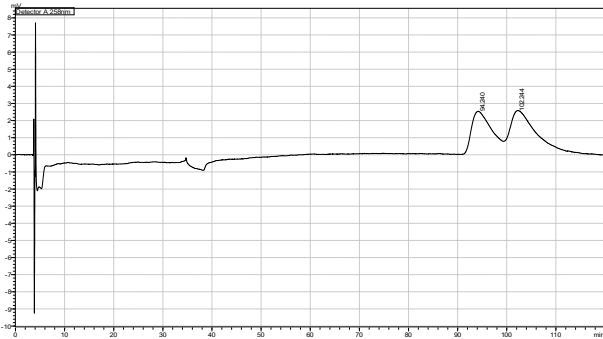
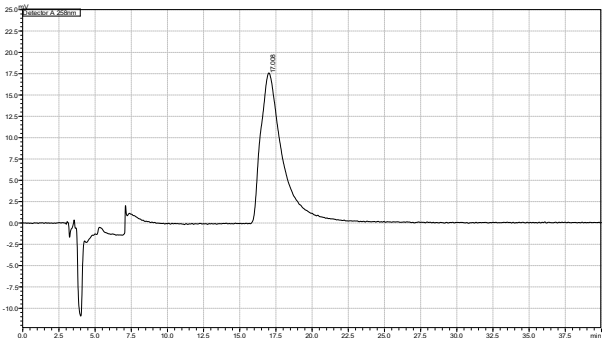
Em seguida, foi avaliada a fase móvel contendo acetonitrila, água e trietilamina. A utilização da proporção 50:50:0,1 levou a uma enantioseparação melhor que do que aquela obtida com o metanol, contudo a resolução de 1,37 ainda encontra-se abaixo do necessário para a resolução de linha de base dos enantiômeros.

O metanol, conforme já descrito anteriormente, possui grande capacidade de formar ligações de hidrogênio, sendo este tipo de interação um dos principais entre a FEQ e o analito. Ao utilizar metanol, este também interage com o seletor quiral, competindo com o analito. A acetonitrila não possui grupo OH, deste modo não realiza ligações de hidrogênio com o seletor quiral. Portanto, ao substituir metanol por acetonitrila na fase móvel, o analito interage melhor com a fase estacionária, melhorando a discriminação quiral dos enantiômeros.

Avaliou-se também a fase móvel contendo etanol como solvente orgânico. Contudo, os resultados obtidos apresentaram parâmetros cromatográficos inferiores à fase móvel contendo acetonitrila, água e trietilamina.

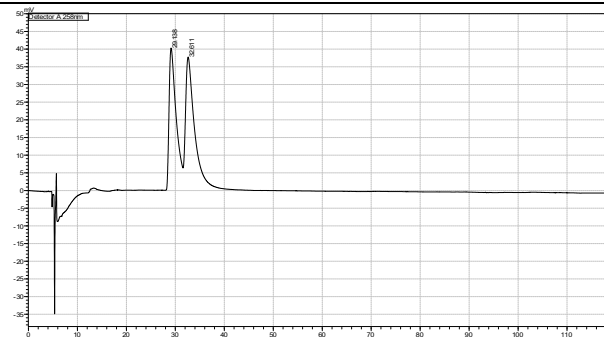
Posteriormente, avaliou-se a enantiosseletividade do difosfato de cloroquina no modo normal, em diferentes composições de fase móvel. Para compostos básicos, assim como na fase reversa, torna-se necessário adicionar a trietilamina. Os principais resultados obtidos estão descritos na **Tabela 36**.

Tabela 36: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina no modo normal, na coluna Chiralpack ID.

Fase móvel	Enantiômero 1		Enantiômero 2		R	Cromatograma
	Tr (min)	S	Tr (min)	S		
hexano: isopropanol: triethylamina (98:02:0,1)	94,2	-	102,2	-	0,9	
hexano: isopropanol: triethylamina (90:10:0,1)	17,0	-	-	-	-	

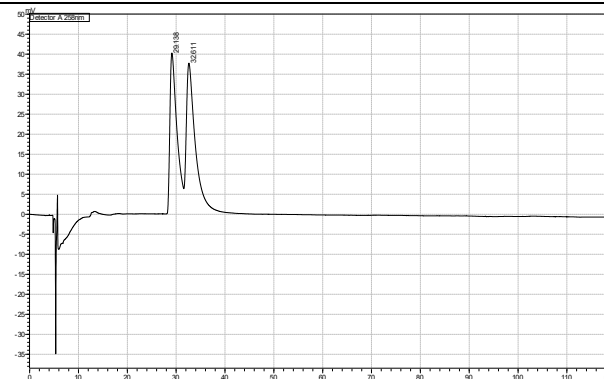
hexano:MTBE:
isopropanol:
triethylamina
(80:20:2:0,1)

44,2 3,2 50,7 2,7 1,7



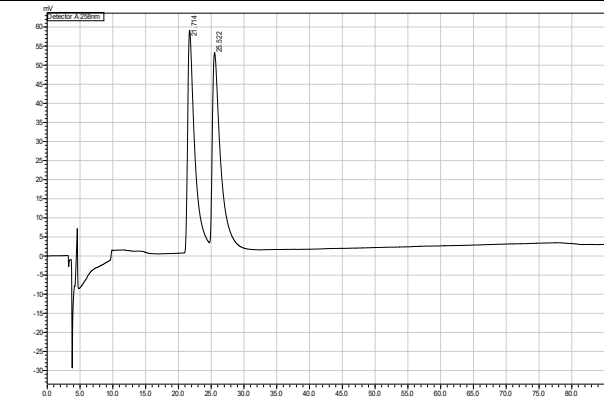
hexano:MTBE:
isopropanol:
triethylamina
(80:20:3:0,1)

29,1 - 32,6 - 1,2



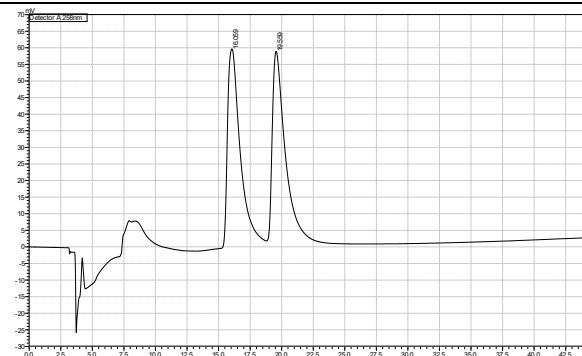
hexano:MTBE:
etanol:
triethylamina
(70:30:2:0,1)

21,7 2,4 25,5 2,4 1,9



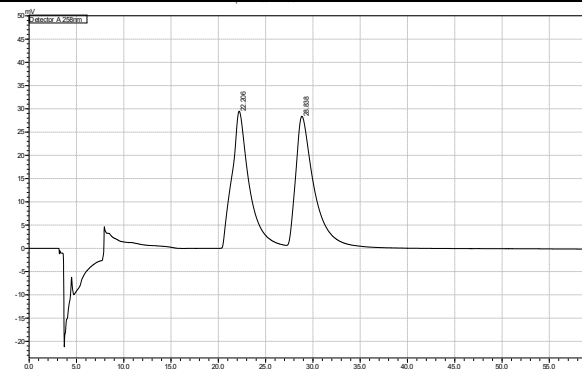
hexano:MTBE:
etanol:
trietilamina
(50:50:2:0,1)

16,1 2,1 19,6 2,5 2,1



hexano:MTBE:
etanol:
trietilamina
(50:50:1:0,1)

22,2 1,3 28,8 1,8 1,9



No modo normal, é recomendado misturas de alcãno e álcool como modificador orgânico (metanol, etanol e 2-propanol) na composição da fase móvel (EL-BEHAIRY, EL-AZZOUNY, 2016).

Neste modo, a retenção do analito na fase estacionária é reduzida com o aumento da polaridade da fase móvel. As fases móveis avaliadas foram constituídas de um solvente com caráter mais apolar (hexano), variando-se o tipo de modificador orgânico (metil-t-butil éter, isopropanol e etanol). De acordo com Snyder (1997), a ordem crescente de polaridade dos solventes orgânicos é: metil-t-butil éter < isopropanol < etanol.

De acordo com o protocolo de desenvolvimento, a fase móvel inicial constituiu-se de hexano: isopropanol: trietilamina. É possível observar através dos cromatogramas que a redução da proporção do solvente orgânico isopropanol resultou em tempos de retenção maiores e conseqüentemente melhor enantiosseparação. Contudo, os elevados tempos de retenção e a baixa resolução demonstraram que esta condição não foi ideal.

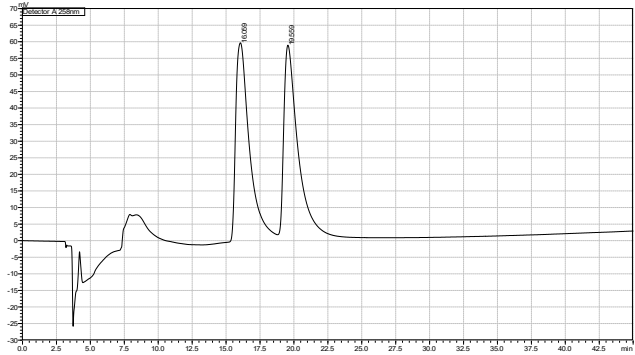
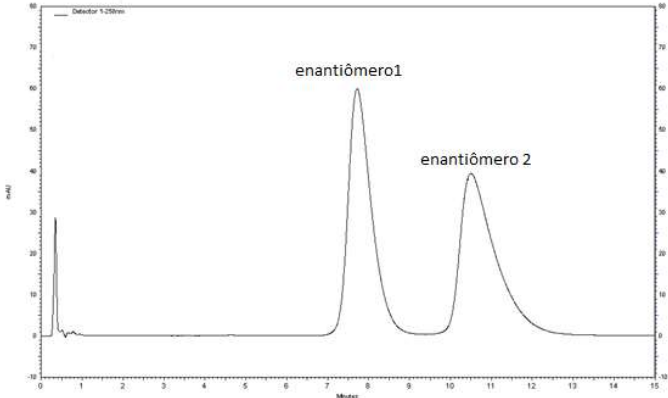
Posteriormente, a fim de melhorar a enantiosseparação e reduzir os tempos de retenção, foi avaliada a fase móvel constituída de hexano: metil-t-butil éter: isopropanol: trietilamina. A melhor condição foi obtida com a fase móvel na proporção de 80:20:2:0,1, na qual a resolução encontrada foi de 1,7 e os tempos de retenção foram 44,2 e 50,7 min para os enantiômeros da cloroquina, bem menores do que aqueles obtidos com a fase móvel sem o modificador orgânico metil-t-butil éter.

Apesar dos parâmetros obtidos com a fase móvel contendo hexano: metil-t-butil éter: isopropanol: trietilamina terem sido superiores àqueles encontrados com a fase móvel constituída de hexano: isopropanol: trietilamina, os tempos de retenção ainda foram bastante elevados. Deste modo, foi avaliada a fase móvel contendo hexano: metil-t-butil éter:etanol: trietilamina. A proporção 50:50:2:0,1 levou à obtenção de parâmetros cromatográficos superiores aos obtidos com as outras fases avaliadas, com uma resolução de 2,1 e tempos de retenção de 16,1 e 19,6 minutos para os enantiômeros 1

e 2 do difosfato de cloroquina. Desta forma, a substituição de isopropanol por etanol na fase móvel se mostrou adequada para a enantioseparação do fármaco.

No presente trabalho, avaliou-se a enantioseparação do difosfato de cloroquina utilizando as colunas cromatográficas tipo glicopeptídeo macrocíclico (Chirobiotic V) e do tipo polissacarídeo (Chiralpak ID). As melhores condições obtidas com as colunas Chirobiotic V e Chiralpak ID estão descritas na **Tabela 37**.

Tabela 37: Cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos para a análise do difosfato de cloroquina na coluna Chirobiotic V e Chiralpak ID.

Fase estacionária	Fase móvel	Enantiômero 1		Enantiômero 2		R	Cromatograma
		Tr (min)	S	Tr (min)	S		
Chiralpak ID	hexano: MTBE: etanol: triethylamina (50:50:2:0,1)	16,1	2,1	19,6	2,5	2,1	 <p>The chromatogram for Chiralpak ID shows two distinct peaks. The first peak is at a retention time of 16.1 minutes with a signal of approximately 60. The second peak is at 19.6 minutes with a signal of approximately 55. The baseline is relatively flat with minor noise.</p>
Chirobiotic V	metanol: AA: TEA (100:0,12:0,12)	7,7	1,4	10,5	1,9	2,1	 <p>The chromatogram for Chirobiotic V shows two peaks labeled 'enantiômero1' and 'enantiômero2'. Enantiômero1 is at 7.7 minutes with a signal of approximately 60. Enantiômero2 is at 10.5 minutes with a signal of approximately 40. The baseline is flat with minimal noise.</p>

Ambas as colunas cromatográficas conseguiram separar os enantiômeros, apresentando uma resolução de 2,1 para a coluna Chirobiotic V e 1,9 para a Chiralpak ID. Apesar das simetrias encontradas terem sido similares, tempos de retenção obtidos com a Chirobiotic V foram relativamente menores que os obtidos com a Chiralpak ID, necessitando de um menor tempo de corrida e consumindo uma menor quantidade de solvente. Deste modo, os parâmetros obtidos com a coluna Chirobiotic V foram melhores que os obtidos com a Chiralpak ID, tendo em vista a resolução e os tempos de corrida.

5.7 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em plasma utilizando coluna tipo glicopeptídeos macrocíclicos

Para a otimização da ionização e detecção de cloroquina e amodiaquina por CLAE-EM/EM no modo ESI(+), foi realizada infusão direta de soluções a 2000 ng/mL de cloroquina e 4000 ng/mL de amodiaquina em metanol. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados, e a voltagem do cone e a energia de colisão foram avaliadas, de modo a obter íons de alta intensidade. A temperatura da fonte do equipamento foi 650 °C. Os íons monitorados e condições de operação otimizadas no espectrômetro de massas estão estabelecidos na **Tabela 38**. Os espectros de fragmentação da cloroquina e amodiaquina estão representados nas **Figuras 27 e 28**.

Tabela 38: Íons monitorados e condições de operação do MS-MS.

Analito	Parent (DA)	Daughter (DA)	Energia do cone (eV)	Energia de colisão (eV)
Cloroquina	320,224	247,200	31	23
Amodiaquina	356,164	283,200	41	23

Figura 27: Espectros de fragmentação da cloroquina, obtido no modo ESI(+), com fragmento principal m/z 247,2.

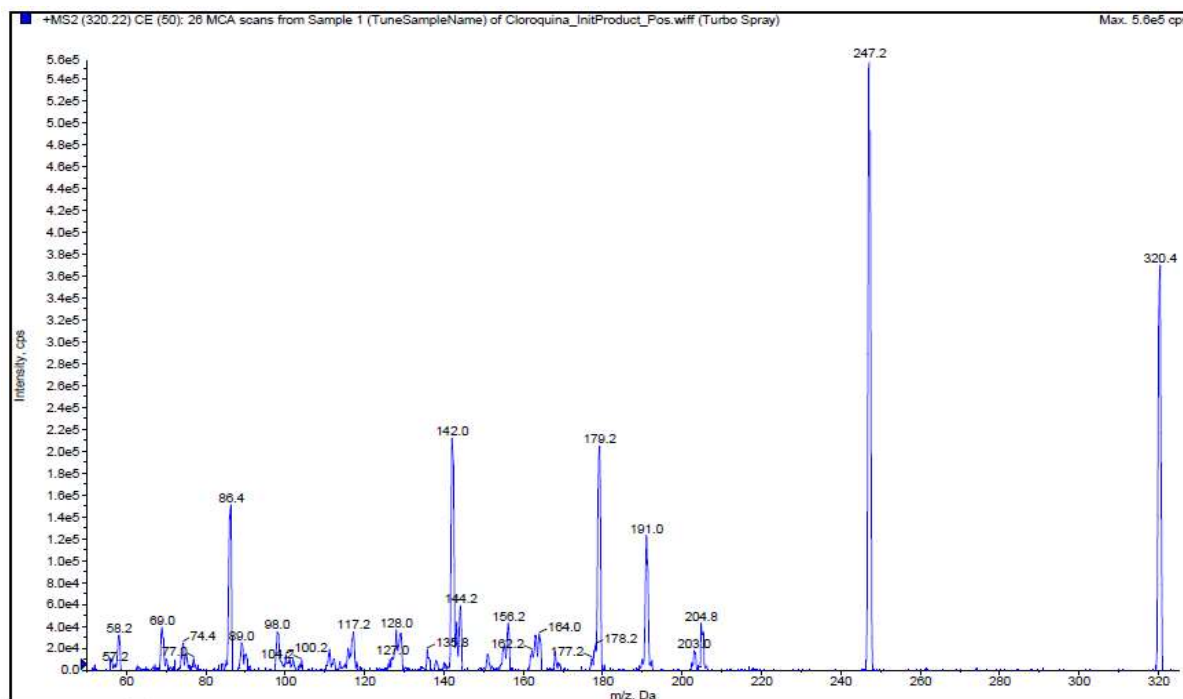
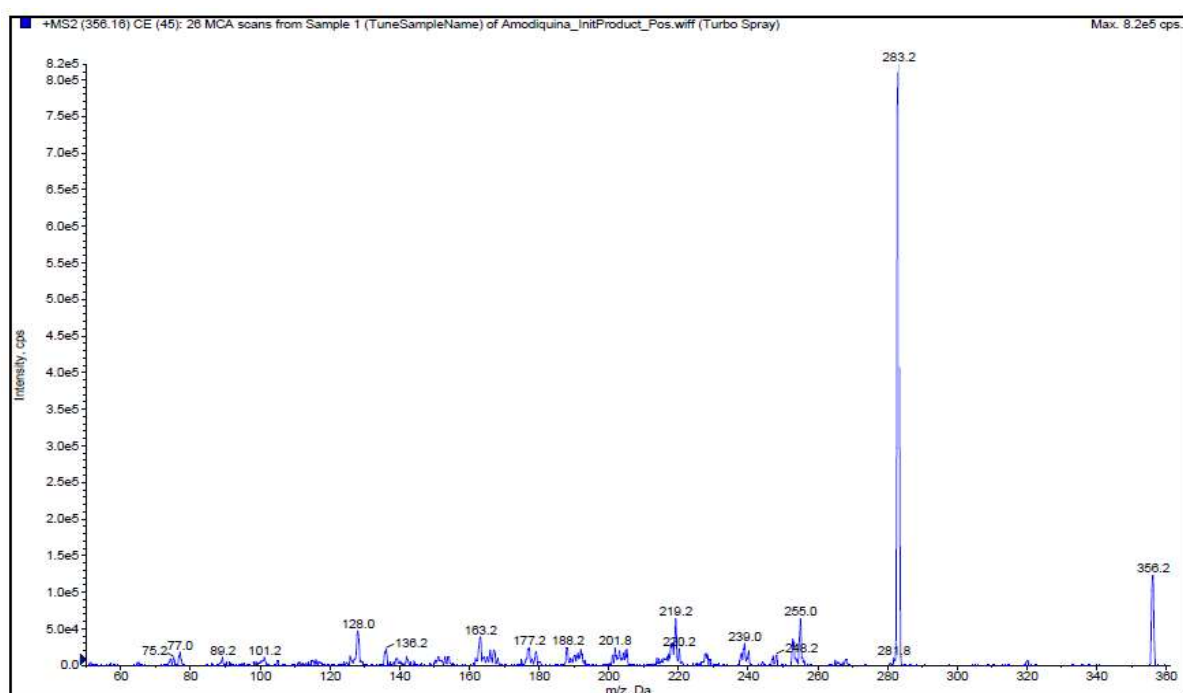


Figura 28: Espectros de fragmentação da amodiaquina, obtido no modo ESI(+), com fragmento principal m/z 283,2.

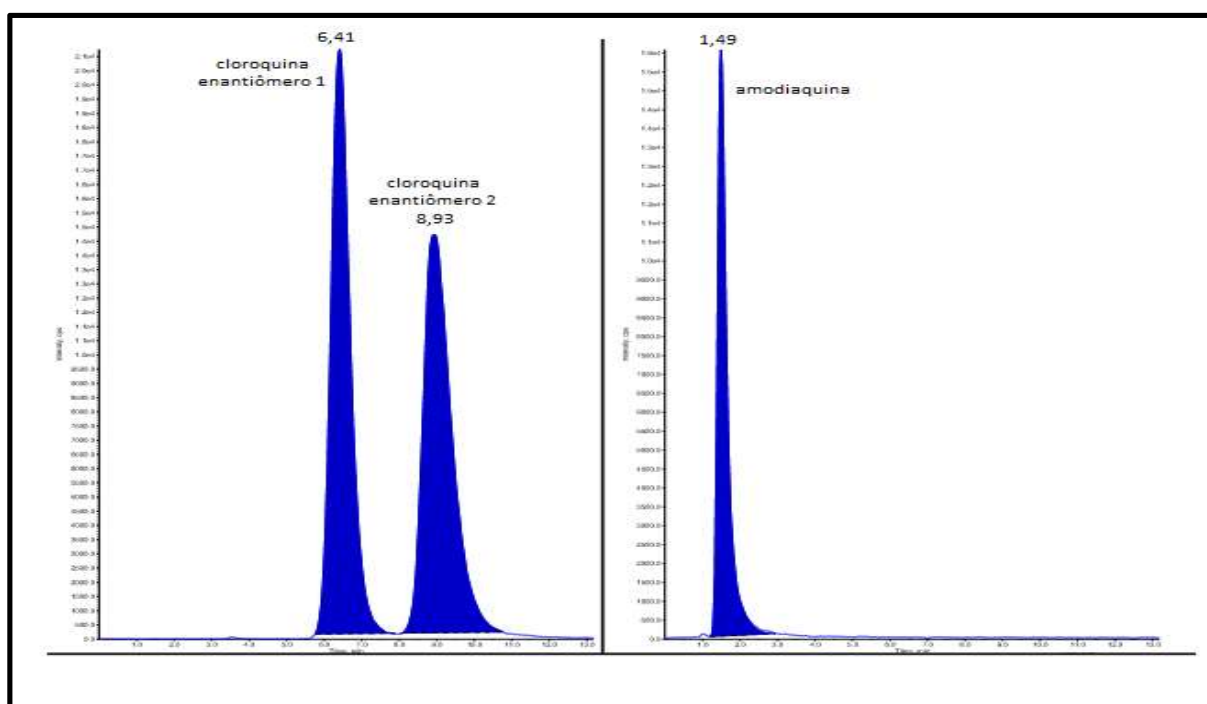


Foi obtido o íon precursor $[M+H]^+$ com relação massa/carga (m/z) igual a 320,224, que corresponde a massa molar da cloroquina (319,88 mg/mol) somada a massa molar do hidrogênio. Após a obtenção do íon precursor, buscou-se otimizar os parâmetros para selecionar o fragmento com maior intensidade do íon precursor. No espectro de fragmentação obtido com uma energia de colisão de 23 eV (Daughter Scan), o fragmento de maior intensidade foi o íon com m/z 247,200. Assim, a transição escolhida para detecção da cloroquina foi de m/z 320,224 para 247,200.

A amodiaquina foi selecionada com padrão interno devido à semelhança estrutural com a cloroquina, tendo em vista que ambos são classificados como 4-aminoquinolinas. Além disto, no estudo desenvolvido por Miranda (2013) para quantificação de cloroquina e primaquina em plasma humano, amodiaquina foi utilizada com sucesso como padrão interno. Como a amodiaquina não é uma substância quiral, ela apresentou apenas um pico cromatográfico nas condições estabelecidas para o método, que foi utilizado para padronização interna dos dois enantiômeros de cloroquina.

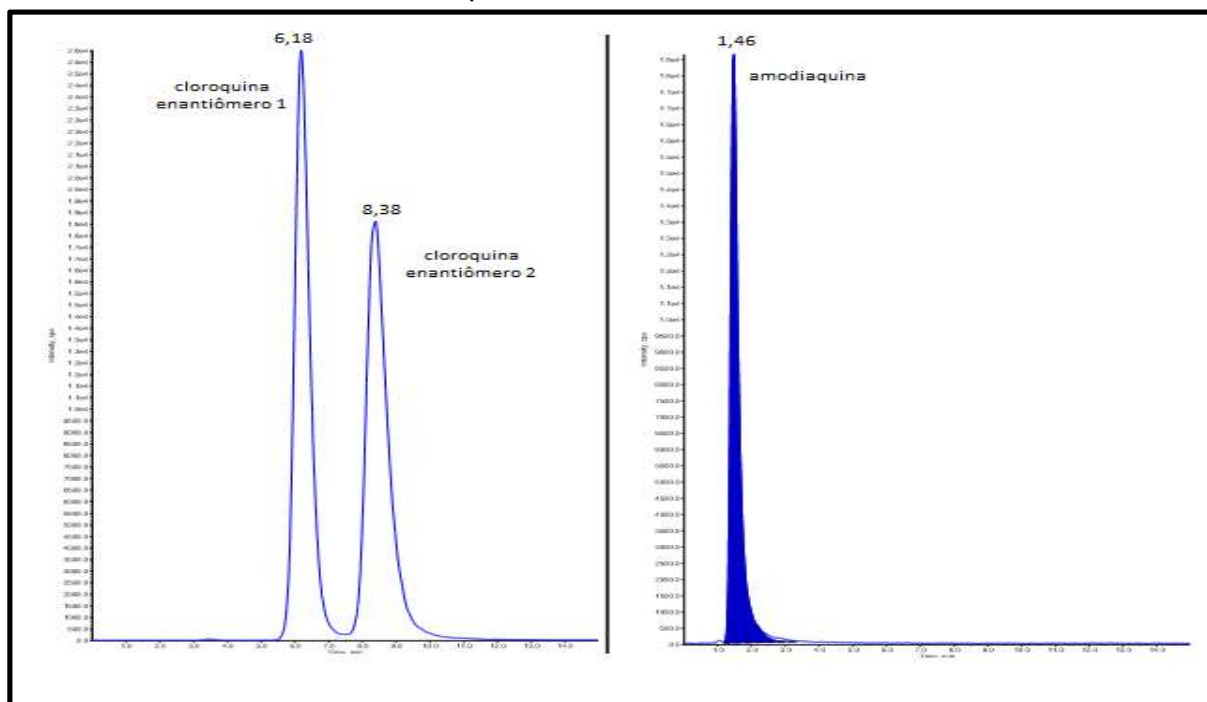
Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas estabelecidas neste estudo para quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos. Foi utilizada coluna Chirobiotic V® (100 x 2,1 mm, 5 μ m), mantida a 25 °C, e fase móvel composta por metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo de 1 mL/min. As concentrações das soluções avaliadas foram 2000 ng/mL para cloroquina e 4000 ng/mL para amodiaquina, ambas em metanol. O cromatograma obtido nesta condição está representado na **Figura 29**.

Figura 29: Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM, no modo ESI(+), para quantificação de cloroquina, utilizando-se coluna Chirobiotic V e fase móvel composta por metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo da fase móvel 1,0 mL/min, temperatura da coluna 25°C.



Alguns parâmetros foram otimizados para melhorar a detecção. O fluxo foi alterado para 1,1 e a temperatura da coluna para 30°C. O cromatograma obtido para esta condição está representado na **Figura 30**.

Figura 30: Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM, no modo ESI(+), para quantificação de cloroquina, utilizando-se coluna Chirobiotic V e fase móvel composta por metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo da fase móvel 1,1 mL/min, temperatura da coluna 30 °C.



A otimização do método buscou aumentar o sinal dos picos, reduzir os tempos de retenção, mas mantendo uma enantiosseparação suficiente para que as áreas dos picos permanecessem equivalentes, uma vez que a solução amostra injetada se tratava de uma mistura racêmica. Em ambas as condições foi possível quantificar os enantiômeros, contudo a segunda condição apresentou sinais mais intensos dos picos em menores tempos de retenção, por isto foi o método de escolha.

A validação do método analítico está em andamento, assim como a análise das amostras dos voluntários para monitorização terapêutica, a fim de quantificar os enantiômeros da cloroquina em plasma humano.

O controle das concentrações plasmáticas constitui na atualidade uma prática habitual na terapia com diferentes classes de fármacos, visando o estabelecimento de regimes de dosagem apropriados para determinados pacientes. Isto porque as concentrações

de um fármaco no plasma correlacionam-se melhor com a resposta farmacológica do que a dose administrada (HARDMAN *et al.*, 2003).

A monitorização terapêutica é baseada no fato de que a resposta terapêutica depende da concentração plasmática do fármaco. O tratamento antimalárico é eficaz somente se as concentrações dos medicamentos no sangue são adequadas. Falhas de tratamento ocorrem devido a baixas concentrações de fármaco no sangue, resistência ou ambos (WHITE *et al.*, 2008).

O objetivo da monitorização terapêutica neste caso é avaliar possível diferença na farmacocinética dos enantiômeros da cloroquina, a fim de contribuir para a elucidação dos aspectos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco.

6 Conclusão

- Um método cromatográfico por CLAE em coluna quiral a base de glicopeptídeos macrocíclicos para a quantificação dos enantiômeros da cloroquina em comprimidos foi desenvolvido e validado. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo provido de detector de arranjo de diodos (DAD) e coluna Chirobiotic V® (100 x 2,1 mm x 5 µm). Durante o desenvolvimento do método, foram avaliados os modos polar iônico e reverso. Na condição cromatográfica validada, utilizou-se a coluna Chirobiotic V® mantida a 25 °C, fase móvel contendo metanol: ácido acético: trietilamina (100:0,12:0,12), fluxo de 1 mL/min, tempo de corrida de 15 minutos e detecção a 258 nm. O método demonstrou ser seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 24 a 36 µg/mL para cada enantiômero.

- A quantificação dos enantiômeros de cloroquina em comprimidos atualmente utilizados no país foi realizada utilizando-se o método desenvolvido e validado e permitiu a constatação de que o fármaco está presente como racemato nos medicamentos, além de apresentar teor condizente com a especificação da Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

- Avaliou-se a enantioseparação dos enantiômeros da cloroquina por CLAE em coluna quiral a base de polissacarídeos. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo provido de detector de arranjo de diodos (DAD) com detecção a 258 nm e coluna Chiralpak ID® (250 x 4,6 mm x 5 µm), mantida a 25 °C, em fluxo de 1 mL/min. Avaliou-se o modo normal e reverso. Os melhores parâmetros cromatográficos foram obtidos com a fase móvel contendo hexano: metil-t-butil éter: etanol: trietilamina na proporção 50:50:2:0,1.

- Foi desenvolvido o método para quantificação dos enantiômeros de cloroquina por espectrometria de massas, empregando fonte de ionização por *electrospray* e analisador triplo quadripolo. A validação do método analítico está em andamento assim como a análise das amostras dos voluntários para monitorização terapêutica destes enantiômeros.

7 REFERENCIAS

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ABOU-BASHA, L.I. HPLC Separation of Nandolol and Enantiomers on Chiralcel OD Column. *Journal Liquid Chromatography*, New York, v. 19, p. 383-392, 1996.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization Strategies for HPLC Enantioseparation of Racemic Drugs Using Polysaccharides and Macrocyclic Glycopeptide Antibiotic Chiral Stationary Phases. *Il Farmaco*, v. 57, n. 7, p. 513–529, 2002.

AHMED, M. *New monolithic chiral stationary phases for the enantioselective nano-liquid chromatographic separation of racemic pharmaceuticals*. 2014, 269f. Tese de Doutorado - Faculdade de Educação, Ciência, Tecnologia e Matemática - Universidade de Canberra, Canberra, Austrália, 2014.

AHUJA, S. S. A strategy for developing HPLC Methods for Chiral Drugs. *The Application Notebook*, p. 79, 2008.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Mechanistic principles in chiral separation using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia*, v. 63, n.7, p. 295-307, 2006.

ALI, I.; SALEEM K.; GAITONDE I. H. V.; ABOUL-ENEIN H. Y. Polysaccharides Chiral Stationary Phases in Liquid Chromatography. *Separation & Purification Reviews*, v. 38, p. 97–147, 2009.

ARMSTRONG, D. W.; TAMG, Y.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; BAGWELL, C.; CHEN, J. R. Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 9, p. 1473-1484, 1994.

AUGUSTIJNS, P.; VERBEKE, N. Stereoselective Pharmacokinetic Properties of Chloroquine and De-Ethyl-Chloroquine in Humans. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 24. n. 3, p. 259-269, 1993.

BAO, X.; SNURR, R.Q.; BROADBELT, L. J.; Insights into the complexity of chiral recognition by a three-point model. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.172, p. 44-50, 2013.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais. *Química Nova*, v. 20, n. 6, 1997.

BEESLEY, T. E.; LEE, J. T. *Method Development and Optimization of Enantioseparations. Using Macrocyclic Glycopeptide Chiral Stationary Phase*. Chiral Separation Technics. 3 ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

BELAZ, K. R. A. *Quantificação de metabolitos do Albendazol em Plasma bovino por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência, Com Injeção Direta de Amostras*. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade de São Carlos, São Paulo, 2007.

BERTHOD, A.; Chiral Recognition Mechanism. *Analytical Chemistry*, v. 78, n.7, p. 2093-2099, 2006.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. R. Análise enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. *Manual de Terapêutica da Malária*. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária*. Brasília, 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. Diário Oficial da União, Brasília, 31 de maio de 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância em saúde*. Brasília, 2014.

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

CAREY, F.; *Organic Chemistry*. 2.ed., New York: Mc Graw-Hill, 1992.

CASS, Q. B. DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos estratégias e Validação*. São Carlos. UFSCar. 2001. p. 77.

CAS, S Q. B.; TIRITAN, E. M.; BASS, I. A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: Desenvolvimento, Aplicações e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo. vol. 20. n.1, 1996.

CÉSAR, I. C. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano. Tese de doutorado. (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de

Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Fármacos e medicamentos. Belo Horizonte, 2009.

CHIROBIOTIC HANDBOOK. *Advanced Separation Technologies*. Estado Unidos da América, 5.ed., 2004. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/chirobiotic_handbook.pdf. Acesso em: 03 Ago. 2016.

CIRILLI, R.; FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; TURCHETTO, L.; BOLASCO, A.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; PIERINI, M.; FARES, V.; BEFANI, O.; LA TORRE, F. Enantiomers of C5-chiral 1-acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole Derivatives: Analytical and Semipreparative HPLC Separation, Chiroptical Properties, Absolute Configuration, and Inhibitory Activity Against Monoamine Oxidase. *Chirality*, v. 16, n. 9, p. 625–636, 2004.

CLEVELAND, T.; Pirkle-Concept Chiral Stationary Phases for the HPLC Separation of Pharmaceutical Racemates. *Journal Liquid Chromatography*. v.18. p. 649-671, 1995.

COELHO, A.S. *Estudo de Estabilidade da Cloroquina Insumo Farmacêutico Ativo e Comprimidos: Testes de Degradação Forçada e Desenvolvimento de Método Indicativo de Estabilidade*. 2016. 109 f. Dissertação em Ciências Farmacêutica – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., BONATO P. S. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. IN: Fundamentos de cromatografia. Campinas: Ed. Unicamp, 2006, p. 273-398.

DAICEL. *HPLC screening strategy Immobilized Polysaccharide*. Disponível em: <<http://www.ctk.com/layouts/default/image/files/CHIRALPAK-ID.pdf>>. Acesso em: 19 Ago. 2016.

DAICEL. *Instruction Manual for Chiralpak® ID Columns*. Disponível em: <<http://chiraltech.com/polysaccharide-columns/>>. Acesso em: 14 Ago. 2016.

DAVANKOV, V. A.; The nature of chiral recognition: Is it a three-point interaction? *Chirality*, v. 9, n. 2, p. 99-102. 1997.

DESAI, M.J.; ARMSTRONG, D.W. Transforming chiral liquid chromatography methodologies into more sensitive liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry without losing enantioselectivity. *Journal of Chromatography A*. v. 1035. 203-210, 2004.

DUCHARME J.; FARINOTTI R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine: focus on recent advancements. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 31, p. 257-274, 1996.

EL-BEHAIRY, M., F.; EL-AZZOUNY; Enantioselective HPLC separation of bioactive C5-chiral 2-pyrazolines on lux amylose-2 and luz cellulose-2: Comparative and mechanistic

approaches. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 39, n. 7, p. 346-353, 2016.

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

FINK, E.; MINET, G.; NIKEL, P., *Arzneimittelforschung*, v. 29, 1979. p.163–164.

FU, S.; BJORKMAN, A.; WAHLIN, B.; OFORI-ADJEI, D.; ERICSSON, O.; SJOQVISTLN, F.; In vitro activity of chloroquine, the two enantiomers of chloroquine, desethylchloroquine and pyronaridine against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 22, n. 1, 1986.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, v.68, p. 305A – 309A, 1996.

HABERKORN, A.; KRAFT, H.P.; BLASCHKE, G.; *Tropenmed Parasitology*, v. 30, 1979, p. 308–312.

HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E. (ed.) Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2003

HESSE, G. HAGEL R. Eine Volständige Racemattrennung Duch Elutions Chromatografie da Cellulose-Tri-Acetat. *Chromatography*, v. 6, p. 227-280, 1973.

HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. B. Chirality: pharmacological action and drug development. In: BROWN, C. (Ed.) *Chirality in drug design and synthesis*. London: Academic Press, 1990.

IBRAHIM, K.E.; FELL, A.F. Separation of chloroquine enantiomers by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 8, p. 449-452, 1990.

ICHIDA, A; SHIBATA, T; OKAMOTO, I.; YUKI, Y.; NAMIKOSHI, H.; TOGA, Y., Resolution os enantiomers by HPLC on celulose derivatives. *Chromatographia*, v. 19, n. 280, p. 2974, 1984.

ILISZ, I.; BERKECZ, R.; PÉTER, A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatography enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-base chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p. 1845-1860, 2009.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQCGCRE-008. 2003.

INTERNACIONAL Conference on Harmonization – ICH. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Geneva: ICH Secretariat, 2005. 17p.

JOTTA, L.A.C.V; CARNEIRO, M.H.S.; Malária: As imagens utilizadas em livros didáticos de biologia. *Encontro nacional de pesquisa em educação em ciência*, 2009.

KOTAKE, M., SAKAN, T., NAKAMURA, N., SENOH, S. Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography. *Journal of the American Chemical Society*, v. 73, p. 2973–2974, 1951.

KRISHNA, S.; WHITE, N.J. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquina. Clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 30. p. 263–99, 1996.

LEVIN, S.; ABU-LAFI, S.; *Advances in Chromatography*. 33. ed., 1993. p.233.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: Uma breve abordagem. *Química Nova*, São Paulo, v. 20. n. 6, 1997.

LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Processes to Separate Enantiomers. *Angewandte Chemie International Edition*. v. 53, n. 5, p.1218–1250, 2014.

LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS. Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química nova*, São Paulo. v.33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of antimalarial drugs and their metabolites. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 6, p. 15-29, 2010.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Enantioselective determination of chloroquine and its *n*-dealkylated metabolites in plasma using liquid-phase microextraction and LC-MS. *Journal Separation Science*, v. 31, p. 3106-3116, 2008.

MIRANDA, T.A.. *Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para quantificação de Cloroquina e Primaquina em Comprimidos e em Plasma Humano*. 2013. 119 f. Dissertação em Ciências Farmacêutica – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MOSS, G. P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Department of Chemistry, Queen Mary University of London: Blackwell Scientific Publications*. p. 8-11, 1996.

NEVES, D.P.; BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium*-malária. *Parasitologia humana*. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161.

OFORI-ADJEI, D.; ERICSSON, O.; LINDSTROM, B.; HERMANSSON, J.; ADJEPON Y.K.; SJOGVIST, F. Enantioselective analysis of chloroquine and desethylchloroquine after oral administration of racemic chloroquine. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.8, p. 457-461, 1986.

OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; FUKUMOTO, T. HATADA, K. Useful chiral Packing Stationary Phase for HPLC. Amylose Tris (3,5-dimethylphenylcarbamate and Tris(2-5-dichlorophenylcarbamate) Suported on Silica Gel. *Chemistry Letters*, p. 1857-1860, 1987.

OKAMOTO, Y.; HATANO, K.; ABURATANI, R.; HATADA, K. Tris(4-tbutylphenylcarbamate) of cellulose and amylose as useful chiral stationary phases for chromatographic optical resolution. *Chemistry Letters*, p. 715-718, 1989.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography*. v. 13, n.10, p. 708, 1990.

OKAMOTO, Y., KAIDA, Y. Resolution by High Performance Liquid Chromatography Using Polysaccharide Carbamates and Benzoates as Chiral Stationary Phases. *Journal Chromatography A*. v. 666, p. 403-419, 1994.

OKAMOTO Y.; YASHIMA, E. Chiral recognition by optically active polymers. *Molecular Design Polymeric Materials*. Marcel Dekker, Inc: New York. p. 731-746, 1997.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers. *Angewandte Chemie*, International Edition, v. 37 n. 8, 1020–1043, 1998.

ORLANDO, R. M.; CARDOSO, N. F., GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S. Importância Farmacêutica de Fármacos Quirais, *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 4, n. 1, p. 08-14, 2007.

PAULINO, W.R. *Biologia atual: seres vivos e fisiologia*. 9. ed. São Paulo: Ática, 2004. p. 61.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Isomerismo cis-trans: de Werner aos Nossos Dias. *Química Nova*, ed. 21, n. 2, 1998.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 335-385.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validações em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

RONDEN, N.G., NYQUIST, R.A., GILLIE, J.K., NICHOLSON, L.W., GORALSKI, C.T. *4th. International Symposium on Chiral Discrimination*. Montreal, Canada, p. 90, 1993.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. (Ed) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5 ed. EUA: Pharmaceutical Press, 2006. 918 p.

SHANKS, G.D. Treatment of falciparum malaria in the age of drug-resistance. *Journal of postgraduate medicine*. v. 52, n. 4, p.277-280, 2006.

SHEN, J.; OKAMOTO, Y. Efficient Separation of Enantiomers Using Stereoregular Chiral Polymers. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 3, p. 1094–1138, 2016.

SHI XIAO, L.T.; *Enantiomeric separations using macrocyclic glycopeptide based chiral stationary phases, an application and mechanism study*. 2004. 228f. Tese de doutorado – Faculdade de Química Analítica – Universidade Estadual de Iowa, Ames Iowa, 2004.

SIGMA-ALDRICH; *Chiral HPLC column selection and Method development guide*.

Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/T409107.pdf>Canada, 2014. Acesso em: 23 Jul. 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J., GLAJCH J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2 ed., New York, John Wiley and Sons Inc., p. 765, 1997.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Organic chemistry*. 7 ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, p.184-210, 2000.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analítica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2007.

SWEETMAN, S.C. *Martindale: The complete drug reference*. 34. ed. London: Pharmaceutical Press, 2005. p. 444-463.

THE MERCK INDEX. *An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 14. ed. Rahway: Merck Co., 2006.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 39 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*. v. 74, p. 835-855, 2002.

WAINER, I.W.; HPLC chiral stationary phases for stereochemical resolutions of enantiomeric compounds, the current stat of the art. *Drug stereochemistry:analytical methods and Pharmacology* . 2 ed, New York, 1993, p. 139-182.

WANG, T.; WENSLOW, R. M. Effects of Alcohol Mobile-phase Modifiers on the Structure and Chiral Selectivity of Amylose tris(3,5dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phase. *Journal Chromatography A*, v. 1015 n. 1, p. 99–110, 2003.

WHITE, N.J.; STEPNIEWSKA, K.; BARNES, K.; PRICE, R.N.; SIMPSONS, J. Simplified antimalarial therapeutic monitoring: using the day-7 drug level. *Trends in parasitology*, v. 24. n. 4. p. 159-163, 2008.

WHO, World Health Organization. *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010*. WHO, Geneva, 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf>. Acesso em 15 mai. 2015.

WHO, World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3^a ed., WHO, Geneva, 2015a. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

WHO, World Health Organization. *World Malaria Report 2015*. WHO, Geneva, 2015b. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

WHO, World Health Organization. *World Malaria Report 2016*. WHO, Geneva, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

WINGER, M.; CHRISTEN, M.; VAN GUNSTEREN, W. F. On the Conformational Properties of Amylose and Cellulose Oligomers in Solution. *International Journal Carbohydrate Chemistry*, v. 2009, p.1–8, 2009.

WINSTANLEY, P; Modern chemotherapeutic options for malaria. *Malaria chemotherapy. The Lancet Infectious Diseases*. v. 1, n. 4, p. 242-250, 2001.

WHITE, N.J.; STEPNIEWSKA, K.; BARNES, K.; PRICE, R.N.; SIMPSONS, J. Simplified antimalarial therapeutic monitoring: using the day-7 drug level. *Trends in parasitology*. v. 24. n. 4. p. 159-163, 2008.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002.

WONGWAN S.; SCRIBA G.K.E. Development and validation of a capillary electrophoresis assay for the determination of the stereoisomeric purity of Chloroquine enantiomers. *Electrophoresis*. v. 32. n. 19. p. 2669-2672, 2011.

VANZOLINI, K.L. *Métodos para determinação enantiomérica dos Fármacos Omeprazol e Pantoprazol em Águas Residuais e de Estuário*. 2009. 160 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade de São Carlos, São Paulo, 2009.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral recognition mechanism of polysaccharide chiral stationary phase in the Impact of Stereochemistry on Drugs Development and Use. *John Wiley & Sons*: New York. 1997.

YONGZHU, J.; HIROSE, K.; NAKAMURA T.; NISHIOKA R.; UESHIGE T.; TOBE Y. Preparation and evaluation of a chiral stationary phase covalently bound with a chiral pseudo-18-crown-6 ether having a phenolic hydroxy group for enantiomer separation of amino compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1129, n. 2, p. 201-207, 2006.

ZHANG, T.; FRANCO, P. Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1191, p. 214-222, 2008.

ZHANG, T.; FRANCO, P.; SUBRAMANIAN, G.; Analytical and preparative potential immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. *Chiral separation techniques: A practical Approach*. 3 ed., c. 3, Wiley-VCH: Weinheim, 2007.