

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

**TIAGO ASSIS MIRANDA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLOROQUINA E  
PRIMAQUINA EM COMPRIMIDOS  
E EM PLASMA HUMANO**

Belo Horizonte

2013

**TIAGO ASSIS MIRANDA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA EM  
COMPRIMIDOS E EM PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti**

**Co-orientadora: Dra. Isabela da Costa César**

Belo Horizonte

2013

M672d Miranda, Tiago Assis.  
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos e em plasma humano / Tiago Assis Miranda. – 2013.  
119 f. : il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.  
Co-orientadora: Isabela da Costa César.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Antimaláricos – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Cromatografia líquida de ultra eficiência – Teses. 4. Cloroquina – Teses. 5. Primaquina – Teses. 6. Espectrometria de massas – Teses. 7. Plasma humano – Teses. 8. Validação de método – Teses. 9. Tecnologia farmacêutica – Teses.  
I. Pianetti, Gerson Antônio. II. César, Isabela da Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4

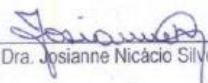
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**TIAGO ASSIS MIRANDA**

**"Desenvolvimento e validação de métodos analíticos  
para quantificação de cloroquina e primaquina em  
comprimidos e em plasma humano"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, e aprovada em primeiro de março de 2013.

### COMISSÃO EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Lisiane da Silveira Ev - UFOP  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Josianne Nicácio Silveira - UFMG  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Isabela da Costa César - UFMG  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gérson Antônio Piahetti - UFMG

Dedico este trabalho à memória de meu pai,  
meu primeiro educador e amigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus, por ser sempre um porto seguro para mim, e pelas oportunidades, desafios e pessoas colocadas em minha vida.

À minha família que amo tanto, meus pais, Lenir e Miranda, aos meus irmãos, Livia e Tadeu, por me darem o suporte necessário para prosseguir. À minha vó Maria e vô Sebastião; e ao vô Felício, exemplos de vida e de amizade. Aos meus tios e tias, primos e primas, a todos os familiares, pelo amor e incentivo recebido.

Ao meu orientador, professor Dr. Pianetti, por todo o apoio e aprendizado dado a minha pessoa, desde quando eu era estagiário de graduação. É um exemplo a ser seguido de profissional, farmacêutico, professor e líder.

À minha co-orientadora, Dra. Isabela, pelo grande apoio, paciência e dedicação oferecidos durante a realização deste trabalho. A realização e conclusão deste trabalho se devem muito à sua orientação.

Aos professores Dr. Christian Fernandes e Dra. Cristina Soares, pelas conversas, sugestões e amizade.

À professora Dra. Luci, pelo apoio e sugestões oferecidas para realização da etapa clínica do estudo.

Ao estagiário “doutor” Pedro, pela disposição em ajudar, por todo caráter e competência demonstrados em suas ações para me ajudar nas atividades no laboratório.

Aos amigos do laboratório, aos mestres e mestrandos Mariana Almeida, Laura Prado, Vinicius Freire, Iara Maíra, Juliana Brêtas, Juliana Baratta, Naialy, Carlos Eduardo, Mateus. Aos doutores e doutorandos Rachel Marcelino, Paula Chellini, Paula Enéas, Fernando Nogueira, Ricardo Byrro, Taízia Dutra, Betânia Freitas, Ana Gabriela, Flávia Dias, aos estagiários Camila, Naiara, Dudu, Zé, Jéssica, Priscila,

Ingrid, Paula; à turma do CEDAFAR Léo, Luciano, Edna, Márcia e Lúcia pelo agradável convívio e amizade ao longo deste tempo.e aos amigos que já saíram do laboratório.

Aos amigos e moradores da república, Douglas e Gustavo pela paciência e amizade. E ao Écio, ex-morador e amigo de todas as horas. Aos amigos de sempre da Faculdade de Farmácia: Diego Santos, Gustavo Laine, Maria Augusta, e todos os outros que sempre estiveram juntos nessa caminhada.

Aos meus amigos-irmãos, Dudu, Rafael Giacomin, Mateusão, Roma, Renato Buneco, Lucas Pará, Marco Túio, Elvânio, Paulo Psycho, Jandaum, Luiza-irmã, Tharcila, Betinha e a todos mais que são como uma família para mim.

À Farmacopéia Brasileira e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pelo por permitir minha atuação profissional durante o desenvolvimento desta dissertação.

À Fiocruz/Farmanguinhos pelo apoio na doação das matérias-primas e comprimidos de cloroquina e primaquina.

Ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos esforços constantes visando o crescimento do nosso Programa.

À todas as pessoas que passaram pelo meu caminho e de alguma forma contribuíram para minha formação e minhas experiências de vida.

*“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível,  
e de repente você estará  
fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis



## RESUMO

A malária é uma doença que afeta a humanidade há tempos, acredita-se que 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de contaminação de malária. Embora em declínio, o quadro epidemiológico da malária no Brasil é preocupante nos dias atuais. Em 2011, foram registrados 267.045 casos no país, dos quais 87% causados pelo *Plasmodium vivax*. No tratamento da malária pelo *P. vivax*, são empregados, de acordo com o Ministério da Saúde, a cloroquina e a primaquina. É extremamente importante conhecer a farmacocinética da cloroquina e da primaquina, quando administrados simultaneamente, visando a garantia de que durante o tratamento, ambos estejam acima da concentração plasmática mínima necessária para a ação farmacológica. Concomitante a necessidades da monitorização terapêutica dos antimaláricos, o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para identificação e quantificação desses fármacos, são de grande importância para avaliar e garantir a qualidade dos medicamentos comercializados e distribuídos atualmente. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos e em plasma humano. Para determinação dos fármacos em comprimidos, dois métodos analíticos foram desenvolvidos e validados: um por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) e um por cromatografia à líquido de ultra eficiência (CLUE). O método por CLAE foi realizado com coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 25 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico, no modo gradiente. Fluxo de fase móvel de 1000 µL /min. O volume de injeção foi de 10 µL e detecção por arranjo de diodos com leitura a 260 nm. O método por CLUE foi realizado com coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm), nas mesmas condições do método por CLAE, à exceção do fluxo da fase móvel de 600 µL/min e o volume de injeção de 7 µL. Os métodos desenvolvidos cumpriram com os parâmetros de validação exigidos e se mostraram adequados para análises rotineiras. Desenvolveu-se, ainda, método bioanalítico por CLAE com detecção por espectrometria de massas e ionização por eletrospray no modo positivo para quantificação de cloroquina e primaquina em plasma, sendo selecionada a amodiaquina como padrão interno. Para o preparo de amostra, foi selecionado a extração líquido-líquido. A análise cromatográfica foi realizada com coluna cromatográfica ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. Fase móvel utilizada foi metanol e solução de acetato de amônio 0,01 M com pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico (30:70), no modo isocrático. O fluxo de fase móvel foi de 1000 µL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. As transições empregadas na detecção por espectrometria de massas para cloroquina, primaquina e amodiaquina foram  $m/z$  320,49 →  $m/z$  246,94,  $m/z$  260,48 →  $m/z$  174,88 e  $m/z$  356,59 →  $m/z$  282,97, respectivamente. O método demonstrou ser seletivo, além de fornecer taxas de recuperação próximas a 100% para todos os fármacos.

*Palavras-chave:* cloroquina, primaquina, antimaláricos, CLAE, CLUE, espectrometria de massas, plasma humano.

## ABSTRACT

Malaria is a disease that has affected humanity for a long time, it is believed that 3.3 billion people live in areas at risk of malaria infection. Although declining, the epidemiological situation of malaria in Brazil is worrying today. In 2011, 267 045 cases were registered in the country, of which 87% caused by *Plasmodium vivax*. In the treatment of malaria by *P. vivax*, are used chloroquine and primaquine, according to the Ministry of Health. It is extremely important to know the pharmacokinetics of chloroquine and primaquine, when administered simultaneously, in order to guarantee that during treatment, both are above the minimum plasma concentration necessary for pharmacological action. Concomitant to the needs of antimalarial therapeutic monitoring, development and application of analytical methods for identification and quantification of these drugs are of great importance to evaluate and ensure the quality of drugs currently marketed and distributed. The aim of this study was to develop and validate analytical methods for the simultaneous quantification of chloroquine and primaquine tablets and in human plasma. To determine the drugs into tablets, two analytical methods have been developed and validated: high performance liquid chromatography (HPLC) and ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC). The HPLC analysis was performed in a C<sub>18</sub> column (100 x 4.6 mm; 5 µm) and mobile phase composed of acetonitrile and 0.1% (v/v) triethylamine's solution with pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid, in gradient mode. The flow rate was 1000 µL/min and the injection volume was 10 µL. The UV detection was in 260 nm. The UHPLC analysis was performed in a C<sub>18</sub> column (50 x 2.1 mm; 1.9 µm) under the same conditions HPLC method, except for the flow rate was 600 µL/min and the injection volume was 7 µL. The developed method complied with all required validation parameters and showed to be adequate for routine analysis. A bioanalytical method by HPLC with detection by mass spectrometry and eletrospray ionization in the positive mode was developed for the quantitation of chloroquine and primaquine in human plasma, with amodiaquine selected as an internal standard. For the sample preparation, was selected to liquid-liquid extraction. The chromatographic analysis was performed using a cyano column (150 x 4.6 mm; 5 µm) and the mobile phase composed of methanol and 0.01 M ammonium acetate solution with pH adjusted to 3.0 with formic acid, in isocratic mode. The flow rate was 1000 µL/min and the injection volume was 20 µL. The employed transitions for the quantitation of chloroquine, primaquine and amodiaquine were m/z 320,49 → m/z 246,94, m/z 260,48 → m/z 174,88 and m/z 356,59 → m/z 282,97, respectively. The method proved to be selective and provides recovery rates close to 100% for all drugs.

*Key words:* chloroquine, primaquine, antimalarials, HPLC, UHPLC, mass spectrometry, human plasma.

## LISTA DE FIGURAS

- 1 - **Distribuição geográfica da malária no mundo** 28
- 2 - **Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*** 33
- 3 - **Fórmula estrutural do difosfato de cloroquina** 40
- 4 - **Fórmula estrutural do fosfato de primaquina** 42
- 5 - **Fórmula estrutural da amodiaquina** 43
- 6 - **Cromatograma representativo do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel em gradiente de (A)acetonitrila:(B)solução de trietilamina a 0,1% pH ajustado para 3,0 (0-0,9 min:10%A; 0,9-1,0 min:10-40%A; 1,0-1,6 min:40%A; 1,6-1,7 min: 40-10%A; 1,7-4,2 min:10%A) fluxo de 1,0 mL/min, coluna C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm) a 25 °C, detector a 260 nm** 66
- 7 - **Cromatograma representativo do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE. Condições cromatográficas: fase móvel em gradiente de (A)acetonitrila:(B)solução de trietilamina a 0,1% pH ajustado para 3,0 (0-0,45 min:10%A; 0,45-0,47 min:10-40%A; 0,47-1,20 min:40%A; 1,20-1,30 min: 40-10%A; 1,30-4,00 min:10%A) fluxo de 600 µL/min, coluna C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,9 µm) a 25 °C, detector a 260 nm** 68

8 -	<b>Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE</b>	69
9 -	<b>Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLAE</b>	70
10 -	<b>Resultados dos teores na avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE</b>	74
11 -	<b>Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE</b>	76
12 -	<b>Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLUE</b>	77
13 -	<b>Resultados dos teores na avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE</b>	81
14 -	<b>Resultados dos teores, em percentagem, na comparação dos métodos de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE e CLUE</b>	83
15 -	<b>Sobreposição dos cromatogramas representativos dos métodos de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE (linha pontilhada) e por CLUE (linha contínua)</b>	84

- 16 - Espectros ESI(+) – MS da primaquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  260,48 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  174,88 98
- 17 - Espectros ESI(+) – MS da cloroquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  320,49 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  246,94 99
- 18 - Espectros ESI(+) – MS da amodiaquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  356,59 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  282,97 101
- 19 - Cromatogramas obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de cloroquina e primaquina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por metanol e tampão acetato de amônio 0,01 M pH 3,0 (70:30). Concentração das soluções: cloroquina 1200 ng/mL, primaquina 600 ng/mL e amodiaquina 400 ng/mL 103

## LISTA DE TABELAS

1 -	<b>Principais fármacos antimaláricos</b>	37
2 -	<b>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)</b>	39
3 -	<b>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)</b>	39
4 -	<b>Condições cromatográficas para quantificação de cloroquina e primaquina</b>	51
5 -	<b>Gradiente da corrida cromatográfica para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE</b>	59
6 -	<b>Soluções para construção da curva analítica e avaliação da linearidade do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Diluente: mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1)</b>	60
7 -	<b>Soluções para avaliação da exatidão do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Diluente: mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1)</b>	61

8 -	<b>Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE</b>	62
9 -	<b>Gradiente da corrida cromatográfica para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE</b>	63
10 -	<b>Alterações realizadas na otimização da transferência do método de CLAE para CLUE</b>	67
11 -	<b>Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE</b>	69
12 -	<b>Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLAE</b>	70
13 -	<b>Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE</b>	71
14 -	<b>Resultados da avaliação da exatidão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE</b>	72
15 -	<b>Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE</b>	74

16 -	<b>Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE</b>	75
17 -	<b>Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLUE</b>	76
18 -	<b>Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE</b>	78
19 -	<b>Resultados da avaliação da exatidão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE</b>	79
20 -	<b>Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE</b>	80
21 -	<b>Comparação dos resultados de quantificação simultânea de cloroquina e primaquina por CLAE e CLUE</b>	82
22 -	<b>Concentrações dos controles de qualidade e limites de quantificação da cloroquina, primaquina e amodiaquina</b>	92
23 -	<b>Preparo das soluções padrão de cloroquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol</b>	93
24 -	<b>Preparo das soluções padrão de primaquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol</b>	93



25 -	<b>Preparo das soluções padrão de amodiaquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol</b>	94
26 -	<b>Resultados da avaliação da seletividade obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina)</b>	105
27 -	<b>Resultados de efeito matriz obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina) na concentração do CQB</b>	107
28 -	<b>Resultados de efeito matriz obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina) na concentração do CQA</b>	108
29 -	<b>Resultados de recuperação obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina)</b>	109

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AMO	Amodiaquina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLO	Cloroquina
CLUE	Cromatografia a líquido de ultra eficiência
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
Conc	Concentração
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
EM	Espectrometria de massas
EQ	Eletroquímico
ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
eV	Elétron Volt (s)
FLU	Fluorimetria
FLUO	Fluorescência

FMN	Fator de matriz normalizado
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
M	Mol por Litro
mAU	Miliabsorbância
MTBE	Metil- <i>t</i> -butil éter
MS	Massas
m/z	Massa / carga
p/v	Peso por volume
PRI	Primaquina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r	Coefficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	Substância química de referência
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
V	Volt (s)
v/v	Volume por volume

# SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1</b>	<b>27</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>32</b>
2.1 Ciclo biológico do parasita	32
2.2 Manifestações clínicas	34
2.2.1 Malária não complicada	34
2.2.2 Malária grave e complicada	34
2.3 Diagnóstico	35
2.3.1 Diagnóstico microscópico	35
2.3.2 Testes rápidos imunocromáticos	36
2.4 Antimaláricos	36
2.5 Tratamento	37
2.5.1 Fosfato de cloroquina	40
2.5.2 Fosfato de primaquina	41
2.5.3 Amodiaquina	43

2.6 Profilaxia	43
2.7 Resistência aos antimaláricos	45
2.8 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em plasma	47
2.8.1 Preparo da amostra	47
2.8.2 Avaliação do efeito matriz	48
2.9 Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de cloroquina e primaquina	49
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
<b>CAPITULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA EM COMPRIMIDOS</b>	<b>55</b>
<b>1 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
1.1 Materiais	56
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras	56
1.1.2 Reagentes e Vidraria	56

1.1.3 Equipamentos	56
1.2 Métodos	57
1.2.1 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos	57
1.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de cloroquina e primaquina	57
1.2.3 Validação do método por cromatografia a líquido de alta eficiência	58
1.2.3.1 Condições cromatográficas	58
1.2.3.2 Linearidade	59
1.2.3.3 Precisão	60
1.2.3.4 Exatidão	60
1.2.3.5 Seletividade	61
1.2.3.6 Robustez	61
1.2.3.7 Limites de detecção e quantificação	62
1.2.4 Validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência	63
1.2.4.1 Condições cromatográficas	63
1.2.4.2 Parâmetros de validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência	63

1.2.5 Comparação entre os métodos por CLAE e por CLUE para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos	64
---	----

<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
---------------------------------	-----------

2.1 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos	65
---	----

2.2 Validação do método por cromatografia a líquido de alta eficiência	68
--	----

2.2.1 Linearidade	68
-------------------	----

2.2.2 Precisão	70
----------------	----

2.2.3 Exatidão	71
----------------	----

2.2.4 Seletividade	72
--------------------	----

2.2.5 Robustez	73
----------------	----

2.2.6 Limites de detecção e quantificação	75
---	----

2.3 Validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência	75
---	----

2.3.1 Linearidade	75
-------------------	----

2.3.2 Precisão	77
----------------	----

2.3.3 Exatidão	78
----------------	----

2.3.4 Seletividade	79
--------------------	----

2.3.5 Robustez	80
2.3.6 Limites de detecção e quantificação	81
2.4 Comparação entre os métodos por CLAE e por CLUE para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos	82
<b>3 CONCLUSÃO</b>	<b>85</b>
<b>CAPITULO 3 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE CLOROQUINA E PRIMAQUINA EM PLASMA HUMANO</b>	<b>86</b>
<b>1 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>87</b>
1.1 Materiais	87
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras	87
1.1.2 Reagentes e Vidraria	87
1.1.3 Equipamentos	87
1.2 Métodos	88
1.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma humano	88
1.2.1.1 Detecção por espectrometria de massas	88



1.2.1.2	Análise cromatográfica	89
1.2.1.3	Extração dos fármacos no plasma	89
1.2.2	Validação do método bioanalítico	91
1.2.2.1	Condições cromatográficas	91
1.2.2.2	Preparo das soluções padrão dos controle de qualidade, de limite superior e inferior de quantificação	91
1.2.2.2.1	Preparo das soluções de cloroquina	92
1.2.2.2.2	Preparo das soluções de primaquina	93
1.2.2.2.3	Preparo das soluções de amodiaquina	94
1.2.2.3	Seletividade	94
1.2.2.4	Efeito matriz	95
1.2.2.5	Recuperação	96
<b>2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>97</b>
2.1	Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma humano	97
2.1.1	Detecção por espectrometria de massas	97
2.1.2	Análise cromatográfica e extração dos fármacos do plasma	101
2.1.3	Validação do método bioanalítico	105

2.1.3.1 Seletividade	105
2.1.3.2 Efeito matriz	106
2.1.3.3 Recuperação	109
<b>3 CONCLUSÃO</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>112</b>

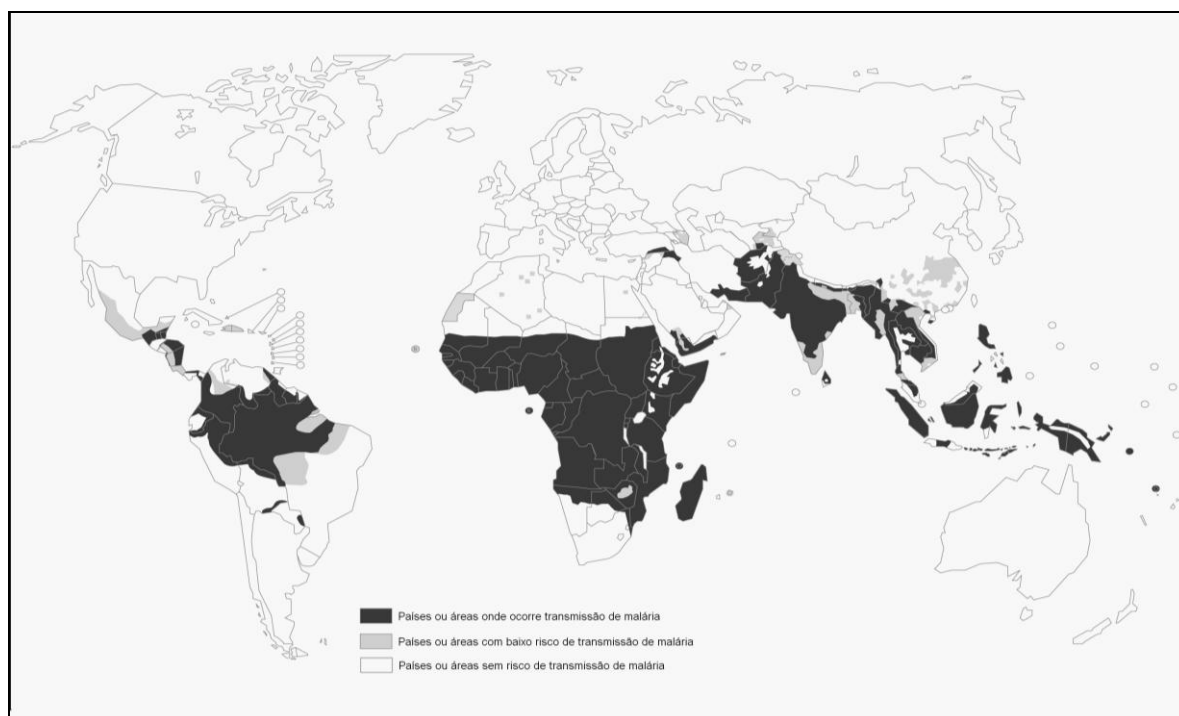
# CAPÍTULO 1



## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que afeta a humanidade há tempos, os primeiros registros dos sintomas associados à malária datam de 2700 a. C., na China. Seus elevados índices de morbidade e mortalidade a caracterizam como importante problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, conforme demonstrado na **Figura 1**. Acredita-se que 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de contaminação de malária. Em 2009, ocorreram cerca de 225 milhões de novos casos, causando por volta de 781 mil mortes. Na África, onde a malária é um problema extremamente grave, a doença é responsável por 20% dos casos de morte na infância. Uma criança africana tem em média entre 1,6 e 5,4 episódios febris de malária a cada ano (CDC, 2011; WHOa, 2011; WHOb, 2010).

**Figura 1 – Distribuição geográfica da malária no mundo.**



Fonte: (WHO, 2013)

Na América Latina, com registro de cerca de 500 mil casos/ano, a maior incidência é verificada na Amazônia Brasileira. O desenvolvimento intensificado dessa região nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira

agrícola, construção de estradas, extração de madeira e mineração. Nesta região, as precárias condições socioeconômicas determinaram a rápida expansão da doença. (MANUAL, 2001)

Embora em declínio, o quadro epidemiológico da malária no Brasil é preocupante nos dias atuais. Em 2011, foram registrados 267.045 casos no país, dos quais 87% causados pelo *Plasmodium vivax*. Destes, mais de 95% concentrados em seis estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. No entanto, a transmissão do *Plasmodium falciparum*, principal responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos. A incidência parasitária anual média foi de 13 casos por 1.000 habitantes, com letalidade de 1,5 em 10.000 casos. (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; WHO, 2010; WHO, 2013).

Os principais objetivos do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) do Ministério da Saúde são 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, sendo as mais importantes o diagnóstico precoce e o tratamento oportuno e adequado dos casos, além de medidas específicas de controle do mosquito transmissor. Para cumprir essa política, há a preocupação em revisar o conhecimento vigente sobre o arsenal terapêutico da malária e sua aplicabilidade para o tratamento dos indivíduos que dela padecem (BRASIL, 2010).

A quimioterapia desempenha papel fundamental no tratamento dos pacientes com diagnóstico da malária, pois interrompe o ciclo de vida do parasita, impedindo as manifestações clínicas da infecção. Diversos medicamentos são utilizados no tratamento das diferentes formas de malária em humanos, atuando em pelo menos duas etapas do ciclo de vida do plasmódio. São empregados em associações medicamentosas, nas quais um possui ação esquizontocida sanguínea ou/e gametocitocida, e no caso do *P. vivax*, o outro possui ação hipnozoiticida. No Brasil,

---

são disponibilizados a quinina, doxiciclina, mefloquina, lumefantrina, derivados da artemisinina, cloroquina e a primaquina (WHOd, 2010).

No tratamento da malária pelo *P. vivax* são empregados, de acordo com o Ministério da Saúde, a cloroquina e a primaquina. Apesar da eficácia destes medicamentos, estudos demonstraram o surgimento de cepas de *P. vivax* resistentes a cloroquina, o que é responsável pela recrudescência, devido à permanência do parasita na circulação acima das concentrações terapêuticas do fármaco, isto é, 100 ng/mL. A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos antimaláricos é um dos principais obstáculos na luta contra a doença. Dificulta o desenvolvimento de esquemas terapêuticos eficazes, aumentado o custo global do controle da doença, e promove o desenvolvimento de epidemias (WHOc, 2010; MANUAL, 2001; AGYEPONG *et al.*, 2002).

É extremamente importante conhecer a farmacocinética da cloroquina e da primaquina, quando administrados simultaneamente, visando a garantia de que durante o tratamento, ambos estejam acima da concentração plasmática mínima necessária para a ação farmacológica. Além disso, os dados podem ser úteis no monitoramento da propensão de cada fármaco em estimular resistência no parasita em função de sua farmacocinética. Outro ponto importante, é que a maioria das reações adversas é dose dependente, sendo importante a monitorização das concentrações plasmáticas e o acompanhamento dos efeitos adversos desses antimaláricos.

A cromatografia líquida acoplada a um espectrometria de massas com fonte de ionização por *eletrospray* é considerada atualmente o método de escolha para análises quantitativas de fármacos em matrizes biológicas. As vantagens de se utilizar a detecção por espectrometria de massas é o aumento na sensibilidade, seletividade e no rendimento do método bioanalítico (EECKHAUT, 2009).

Concomitante a necessidades da monitorização terapêutica dos antimaláricos, o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para identificação e quantificação desses fármacos, são de grande importância para avaliar e garantir a qualidade dos medicamentos comercializados e distribuídos atualmente. É bem

---

conhecido que em várias partes do mundo, incluindo África e sudeste da Ásia, há problemas graves de saúde pública relacionados a medicamentos antimaláricos falsificados ou de má qualidade. A utilização desses medicamentos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência do plasmódio em áreas endêmicas de malária, devido à exposição a doses subterapêuticas do fármaco. (OGA, 1996; ATEMNKENG, 2007).

A sociedade moderna não pode ignorar a prevalência e a mortalidade da malária no mundo. O desenvolvimento de novos e inovadores métodos para o controle do vetor; diagnóstico, tratamento e monitoramento da doença, devem ser estimulados, em conjunto com o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas visando o controle da malária no mundo (GUERIN *et al*, 2002).

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ciclo biológico do parasita

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um parasita do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. No Brasil, nunca foi registrada transmissão autóctone de *P. ovale*, que é restrita a determinadas regiões da África. A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais importante a espécie *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (BRASIL, 2010).

A infecção inicia-se quando os parasitas (esporozoítos) são inoculados na pele pela picada do vetor, os quais irão invadir as células do fígado, os hepatócitos, em cerca de 30 a 60 minutos após a inoculação. Nessas células multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária (BRASIL, 2010; MANUAL, 2001).

O desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. 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. São, por isso, denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Esses hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (geralmente dentro de seis meses) (BRASIL, 2010; MANUAL, 2001).

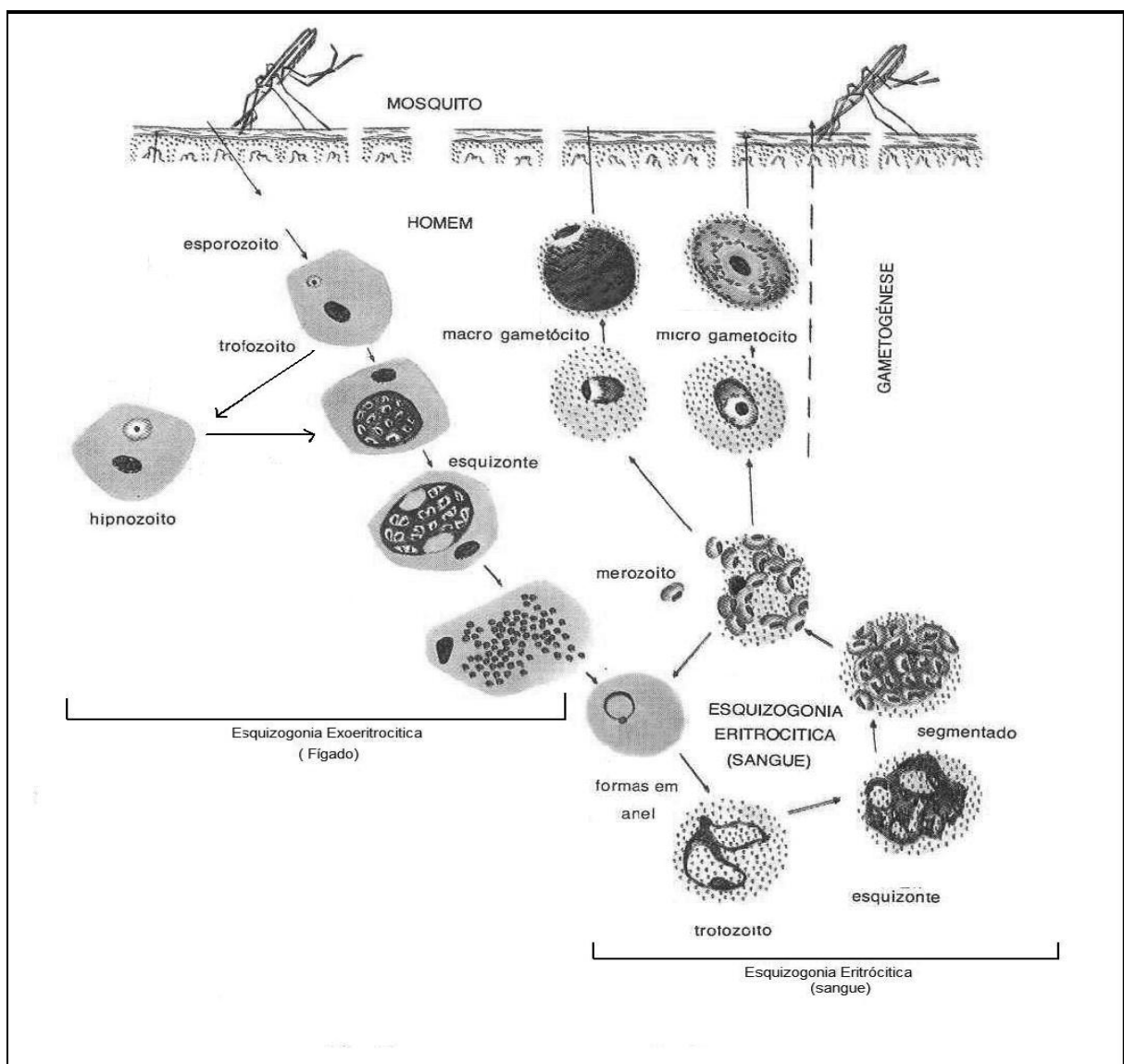
Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos

---



eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasita. O ciclo de vida do *P. vivax* é representado na **Figura 2** (BRASIL, 2010).

**Figura 2 – Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*.**



Fonte: (BRASIL, 2010).

## 2.2 Manifestações clínicas

### 2.2.1 Malária não complicada

O período de incubação da malária varia de 7 a 14 dias, podendo, contudo, chegar a vários meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* e *P. malariae*. A crise aguda da malária caracteriza-se por episódios de calafrios, febre e sudorese. Tem duração variável de 6 a 12 horas e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40 °C. Em geral, esses paroxismos são acompanhados por cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros paroxismos, a febre pode passar a ser intermitente (BRASIL, 2010).

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, as crianças e os primoinfectados estão sujeitos 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 tifóide 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).

### 2.2.2 Malária grave e complicada

O diagnóstico clínico diferencial da febre em um paciente gravemente doente é complicado, pois é um sintoma comum a várias doenças. Por exemplo, a febre pode resultar da meningoencefalite ou malária. Também há considerável sobreposição de diagnóstico entre septicemia, pneumonia e malária grave, além disso essas condições podem coexistir. Se houver alguma dúvida sobre o diagnóstico, o tratamento antibiótico empírico deve ser imediatamente iniciado junto com o tratamento antimalárico (WHOd, 2010).

---

Para o diagnóstico de malária grave, algumas características clínicas e laboratoriais devem ser observadas atentamente, tais como: hemorragias, convulsões, icterícia, hiperpirexia ( $>41$  °C), oligúria, anemia grave, hipoglicemia, insuficiência renal, hiperparasitemia, entre outros. Se presentes, o paciente deve ser conduzido de acordo com as orientações para tratamento da malária grave (BRASIL, 2010).

## 2.3 Diagnóstico

### 2.3.1 Diagnóstico microscópico

Baseia-se no encontro de parasitas no sangue. O método mais utilizado é o da microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de Walker. O exame cuidadoso da lâmina é considerado o padrão-ouro para a detecção e identificação dos parasitas da malária. É possível detectar densidades baixas de parasitas (5 a 10 parasitas por  $\mu\text{L}$  de sangue), quando o exame é feito por profissional experiente. Contudo, nas condições de campo, a capacidade de detecção é de 100 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue (BRASIL, 2010).

O exame da gota espessa permite diferenciação das espécies de *Plasmodium* e do estágio de evolução do parasita circulante. Pode-se ainda calcular a densidade da parasitemia em relação aos campos microscópicos examinados. Um aspecto importante é que a lâmina corada pode ser armazenada por tempo indeterminado, possibilitando o futuro controle de qualidade do exame. A técnica demanda cerca de 60 minutos, entre a coleta do sangue e o fornecimento do resultado. Sendo considerada uma técnica simples e de baixo custo. Sua eficácia diagnóstica depende da qualidade dos reagentes, de pessoal bem treinado e experiente na leitura das lâminas e de permanente supervisão (BRASIL, 2010; GUERIN *et al*, 2002).

---

### 2.3.2 Testes rápidos imunocromáticos

Baseiam-se na detecção de antígenos dos parasitas por anticorpos monoclonais, que são revelados por método imunocromatográfico. Comercialmente estão disponíveis em “kits” que permitem diagnósticos rápidos, em cerca de 15 a 20 minutos. A sensibilidade para *P. falciparum* é maior que 90%, comparando-se com a gota espessa, para densidades maiores que 100 parasitas por  $\mu\text{L}$  de sangue. São de fácil execução e interpretação de resultados, dispensam o uso de microscópio e de treinamento prolongado de pessoal. Entre suas desvantagens estão: não distinguem *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*; não medem o nível de parasitemia; não detectam infecções mistas que incluem o *P. falciparum*. Além disso, seus custos são ainda mais elevados que o da gota espessa e pode apresentar perda de eficiência quando armazenado por muitos meses em condições de campo (BRASIL, 2010).

## 2.4 Antimaláricos

Os antimaláricos podem ser classificados de diferentes maneiras de acordo com suas características químicas, farmacológicas, seu local de ação no ciclo biológico do parasita, as finalidades com que podem ser utilizadas, 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) pelo seu grupo químico em arilaminoálcoois (quinina, mefloquina e halofantrina), 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinonas (atovaquona) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina);
  - b) pelo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasita em esquizonticidas teciduais ou hipnozoitocidas (cura radical do *P. vivax*), esquizonticidas sangüíneos (promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueia a transmissão) e esporonticidas (impede a
-

infecção pelos esporozoítos). Infelizmente, até o momento, nenhum fármaco deste último grupo é disponível para uso em humanos (MANUAL, 2001).

A **Tabela 1** correlaciona os principais antimaláricos à sua categoria química e à sua atividade.

**Tabela 1 – Principais fármacos antimaláricos.**

<b><i>Categoria química</i></b>	<b><i>Fármaco</i></b>	<b><i>Atividade</i></b>
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 esquizonticidas sanguíneo de ação lenta.
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo.

Fonte: (SWEETMAN, 2005).

## 2.5 Tratamento

O tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos chave de seu ciclo evolutivo, os quais podem ser resumidos em: interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias; interrupção da

transmissão do parasita, pelo uso de fármacos que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitas (gametócitos). Para atingir esses objetivos, diversos fármacos são utilizados, cada um deles agindo de forma específica, tentando impedir o desenvolvimento do parasita no hospedeiro (BRASIL, 2010).

A Organização Mundial de Saúde recomenda a monoterapia com cloroquina para o tratamento da malária causada por *P. vivax*, pois o parasita permanece sensível ao medicamento em muitas partes do mundo, incluindo o Brasil. A cloroquina, geralmente, é bem tolerada, os efeitos adversos comuns incluem tontura, náusea, vômito, dor abdominal e coceira (WHOd, 2010).

A primaquina é usada como um complemento ao tratamento com a cloroquina com o propósito de eliminar formas latentes do parasita no fígado e prevenir recaídas tardias, entretanto ela apresenta baixa atividade ao parasita na fase sanguínea do ciclo. O esquema longo de tratamento (14 dias) apresenta uma maior prevenção a recaídas tardias. A primaquina não é recomendada durante a gravidez e na infância, uma vez que os dados de segurança são limitados nesses grupos. Os efeitos adversos comuns incluem uma toxicidade gastrointestinal dose-depedente, fraqueza, anemia hemolítica, metaemoglobinemia e leucopenia (WHOd, 2010)

Para o tratamento da malária por *P. vivax* o Ministério da Saúde recomenda os esquemas terapêuticos representados na **Tabela 2** e na **Tabela 3**.

---

**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 dia
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	½	1	¼	1	¼	1	½
1-3 anos 10-14 kg	1	2	½	1	½	1	1
4-8 anos 15-24 kg	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

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 14º dia
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	½	½	¼	½	¼	½	¼
1-3 anos 10-14 kg	1	1	½	½	½	½	½
4-8 anos 15-24 kg	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	½	2	½	2	½	½
12-14 anos 35-49 kg	3	1	2	1	2	1	½
≥ 15anos ≥ 50 kg	4	1	3	1	3	1	1

Fonte: (BRASIL, 2010).

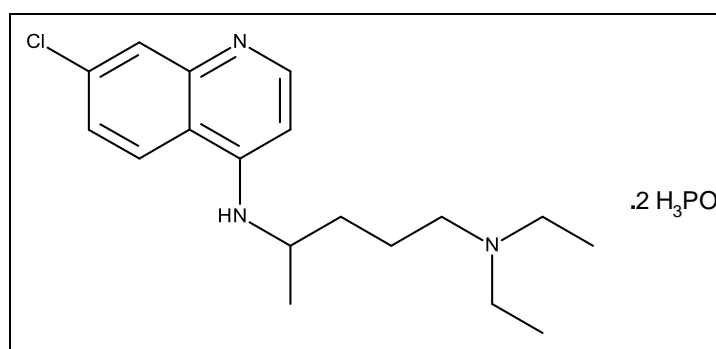
Durante o tratamento é necessário acompanhar o paciente porque a cura clínica e mesmo o desaparecimento total dos parasitas do sangue não significa necessariamente uma cura parasitológica, pois, se não houver a eliminação dos hipnozoítos do *P. vivax* ou ainda se o paciente portar parasitas de malária 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 utilizada para o tratamento, e, no caso de malária causada por *P. vivax*, o acompanhamento deve ser mensal e se possível por seis a 12 meses (MANUAL, 2001).

O tratamento adequado e oportuno tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (MANUAL, 2001).

### 2.5.1 Fosfato de cloroquina

A cloroquina é uma 4-aminoquilonina com rápida atividade esquizonticida 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. A estrutura química do difosfato de cloroquina está representada na **Figura 3** (MANUAL, 2001).

**Figura 3 – Fórmula estrutural do difosfato de cloroquina.**





Suas características físico-químicas estão descritas a seguir (THE MERCK, 2006; VERBEECK, 2005):

- CAS - [50-63-5].
- Fórmula molecular:  $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$
- Massa molar: 515,86 g/mol. Base livre: 319,88 g/mol.
- 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. Log *P*: 3,73. *pKa*: 8,4 e 10,8 a 20 °C.
- Solubilidade: facilmente solúvel em água, pouco solúvel em soluções neutras ou alcalinas. Praticamente insolúvel em etanol, benzeno, clorofórmio e éter etílico.

A cloroquina é rapidamente e quase completamente absorvida no trato gastrointestinal, quando administrada por via oral, porém as concentrações máximas no plasma podem variar bastante. A absorção por via intramuscular e subcutânea também é muito rápida (WHOd,2010).

A cloroquina é amplamente distribuída pelos tecidos do corpo, incluindo a placenta e o leite materno, e apresenta um grande volume de distribuição aparente. Cerca de 60% da cloroquina se liga a proteínas do plasma. A eliminação é bastante lenta, sendo em sua maioria por via renal, apresentando meia-vida de 1 a 2 meses. A cloroquina é metabolizada no fígado, formando, principalmente monodesetilcloroquina (WHOd,2010).

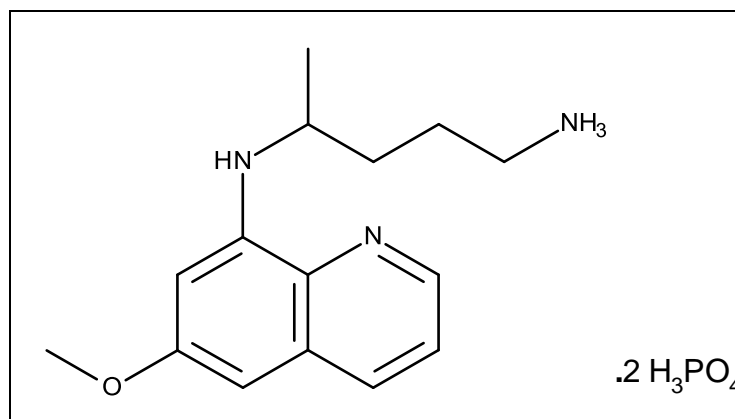
### 2.5.2 Fosfato de primaquina

A primaquina é uma 8-aminoquinolina, denominada 8-(3-amino-1-metilpropilamino)-6metoxiquinolina, desenvolvida em 1946 a partir da pamaquina. Foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1952, para a cura radical da malária causada pelo *P. vivax* e *P. ovale*, devido a sua ação hipnozoitocida, associada a um fármaco esquizontocida. Apresenta também ação gametocitocida contra o *P.*

---

*falciparum*. A estrutura química do fosfato de primaquina está representada na **Figura 4**. (MANUAL, 2001; VALE *et al.*, 2005; DEEN *et al.*, 2008; VALE *et al.*, 2009).

**Figura 4** – Fórmula estrutural do fosfato de primaquina



Características físico-químicas do fosfato de primaquina (THE MERCK, 2006; NAIR, 2012):

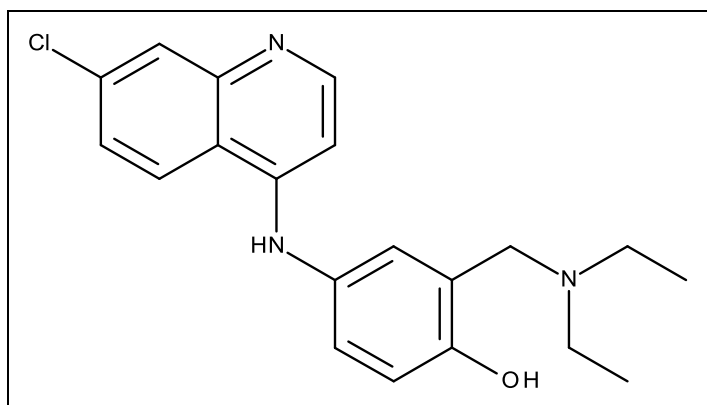
- CAS - [63-45-6].
- Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O.2H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Massa molecular: 455,34 g/mol. Base livre: 259,35 g/mol.
- Descrição: cristais amarelos.
- Ponto de fusão: 197 a 198 °C. Log *P*: 2,72. *pKa*:3,2 e 10,4.
- Solubilidade: ligeiramente solúvel em água.

A primaquina apresenta rápida absorção no trato gastrointestinal. A concentração máxima no plasma ocorre cerca de 1 a 2 horas após a administração e então diminui, com uma meia-vida de 3 a 6 horas. A primaquina é amplamente distribuída nos tecidos humanos, sendo rapidamente metabolizada no fígado. O maior metabólito é a carboxiprimaquina, que pode acumular no plasma com administrações repetidas de primaquina (WHOd, 2010).

### 2.5.3 Amodiaquina

Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico foi selecionado a amodiaquina como padrão interno. As características físico-químicas da amodiaquina. A estrutura química da amodiaquina está representada na **Figura 5**. (THE MERCK, 2006):

**Figura 5 – Fórmula estrutural da amodiaquina**



- CAS - [86-42-0].
- Fórmula molecular:  $C_{20}H_{22}ClN_3O$ .
- Massa molar: 355,86 g/mol.
- Descrição: cristais.
- Ponto de fusão: 208 °C, com decomposição.
- Solubilidade: na forma de cloridrato, é solúvel em água e muito pouco solúvel em benzeno, clorofórmio e éter etílico.

## 2.6 Profilaxia

As medidas mais importantes para reduzir o risco de contrair a infecção malárica e outras infecções transmitidas por vetores são as de proteção individual e coletiva para prevenir, reduzir ou evitar o contato com mosquitos e outros artrópodes (mosquiteiro, repelente, casas teladas, etc.) (MANUAL, 2001).

---

Como medida de proteção individual pode-se citar a chamada profilaxia de contato, que consiste em evitar o contato do mosquito com a pele do homem. Como o anofelino tem, em geral, hábitos noturnos de alimentação, recomenda-se evitar a aproximação às áreas de risco após o entardecer e logo ao amanhecer. Usar repelentes nas áreas expostas do corpo, telar portas e janelas e dormir com mosquiteiros, também são medidas que têm este objetivo. Entretanto, estas estratégias só se aplicam a situações especiais, como para pessoas que eventualmente visitam as áreas endêmicas. O grande contingente de indivíduos que vivem nas áreas de transmissão não consegue, por razões óbvias, adotar constantemente tais medidas (MANUAL, 2001).

Como medidas coletivas, algumas estratégias têm sido consideradas atualmente para reduzir os níveis de transmissão nas áreas endêmicas. Entre elas destacam-se: *medidas de combate ao vetor adulto*, através da borrifação das paredes dos domicílios com inseticidas de ação residual, e/ou nebulização espacial com inseticidas no peridomicílio; *medidas de combate às larvas*, através de larvicidas. Devido à extensão das bacias hidrográficas existentes nas áreas endêmicas e ao risco de contaminação ambiental com larvicidas químicos, esta estratégia tem sido pouco aplicada; *medidas de saneamento básico* para evitar a formação de criadouros de mosquitos, surgidos principalmente a partir das águas pluviais e das modificações ambientais provocadas pela garimpagem; *medidas para melhorar as condições de vida*, através da informação, educação e comunicação, a fim de provocar mudanças de atitude da população em relação aos fatores que facilitam a exposição à transmissão (MANUAL, 2001).

O acesso precoce ao diagnóstico e tratamento também é estratégia importante para a prevenção de doença. No Brasil, a rede de diagnóstico e tratamento de malária encontra-se distribuída nos principais destinos da Amazônia Legal, permitindo o acesso do viajante ao diagnóstico e tratamento precoces. Nas regiões em que a malária não é endêmica, tem-se observado manifestações graves da doença, possivelmente pelo retardo da suspeita clínica, do diagnóstico e do tratamento (BRASIL, 2010).

---

Outra medida de prevenção da malária é a quimioprofilaxia, que consiste no uso de fármacos antimaláricos em doses subterapêuticas, a fim de reduzir formas clínicas graves e o óbito. A quimioprofilaxia deve ser indicada quando o risco de doença grave e/ou morte por malária *P. falciparum* for superior ao risco de eventos adversos graves relacionados aos fármacos utilizados (BRASIL, 2010).

## **2.7 Resistência aos antimaláricos**

A resistência a fármacos antimaláricos é definida como a capacidade adquirida pelo 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, mas 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, da má qualidade do medicamento, das interações com outros fármacos, de deficiência na absorção do fármaco, ou de erros de diagnóstico. Esses fatores também podem acelerar a disseminação da resistência aos antimaláricos pela exposição dos parasitas aos níveis inadequados de princípios ativos (WHOd, 2010).

As razões para o aparecimento e expansão da resistência aos fármacos envolve a interação dos padrões de uso dos medicamentos, características intrínsecas do fármaco, fatores relacionados ao hospedeiro (homem), e fatores ambientais do inseto vetor (WONGSRICHANALAI *et.al.*, 2002).

O desenvolvimento de resistência pode ser dividido em duas partes: a mutação genética do parasita, resultando em um mutante resistente; e subsequente 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. Um ponto importante é a ocorrência de resistência cruzada, em que a resistência do parasita a um fármaco pode causar a resistência a outro fármaco de ação farmacológica semelhante (WHOd,2010).

---

A meia vida de eliminação é um fator importante para avaliar a probabilidade de um antimalárico sofrer resistência. Alguns que são rapidamente eliminados (por exemplo, derivados de artemisinina), não apresentam uma concentração plasmática intermediária que tem ação sobre o parasita, pois são eliminados completamente antes do segundo dia do ciclo de vida assexuado do *Plasmodium*. Outros (por exemplo, a mefloquina e a cloroquina) possuem meia vida longa, de semanas ou meses, e apresentam um amplo período de tempo para a seleção de resistentes (WHOd, 2010).

Têm sido realizados estudos extensivos sobre a resistência adquirida pelo *P. vivax* aos antimaláricos. A cloroquina e a primaquina têm sido usadas como medicamentos de primeira escolha para o tratamento de malária causada por *P. vivax* em muitos países (incluindo o Brasil), há mais de 50 anos. O parasita ainda é sensível à cloroquina, apesar de relatos de resistência em várias partes do mundo, como na Oceania e no Sudeste da Ásia, e mais recentemente, houve casos de resistência na América do Sul. Ao contrário do que se observa com o *P. falciparum*, as fases assexuadas de *P. vivax* são suscetíveis a primaquina. Os únicos fármacos com atividade significativa contra os hipnozoítas são as 8-aminoquinolinas (buloquina, primaquina e tafenoquina), entretanto, em relação à primaquina, já foi documentada ocorrência de resistência no Leste da África, no Sudeste da Ásia e na Oceania (WHOd,2010; YESHIWONDIM, 2010).

Episódios de resistência têm ocorrido em todas as classes de antimaláricos, sendo uma grande ameaça ao controle da malária. O uso generalizado e indiscriminado de antimaláricos exerce uma forte pressão seletiva sobre os parasitas, favorecendo o desenvolvimento de altas taxas de resistência. A resistência pode ser prevenida, ou ter seu início retardado consideravelmente, pela combinação de antimaláricos com mecanismos de ação diferentes, garantindo taxas de cura muito elevadas, se houver cumprimento correto do tratamento. Além disso, o uso de medicamentos de qualidade assegurada, educação à população, prescrição corretas, a aderência do paciente ao tratamento e formulações otimizadas, são os pontos estratégicos para prevenir a ocorrência de resistência aos antimaláricos (WHOd,2010).

---

## **2.8 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em plasma**

O desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos empregados na determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em fluidos biológicos desempenha um papel significativo da avaliação e interpretação da biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e na obtenção de dados toxicocinéticos do fármaco e seus metabólitos. A qualidade destes estudos está diretamente relacionada à qualidade do método bioanalítico (SHAH, 2007).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos. No Brasil, a ANVISA publicou em 17 de maio de 2012 a Resolução RDC nº 27, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, incluindo novos ensaios de validação, como a avaliação de efeito residual e de efeito matriz, em relação à RDC 899/2003 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

Durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, todas as variáveis devem ser consideradas, incluindo o procedimento de amostragem, de preparo da amostra, de separação cromatográfica, de detecção e avaliação de dados. O processo de validação inclui a avaliação da estabilidade do analito na matriz biológica (BRESSOLE, 1996).

### **2.8.1 Preparo da amostra**

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas (soro, plasma e urina, entre outras), requer um tratamento prévio da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a

---

concentração das substâncias a serem analisadas, que normalmente são muito baixas (QUEIROZ *et al.*, 2001).

O preparo da amostra é um elemento chave para validar um método bioanalítico com sucesso. Representa grande parte da atividade do trabalho e dos custos operacionais em um laboratório. A seleção de um processo de preparação específico depende dos analitos de interesse, das concentrações de análise, da matriz da amostra, do tamanho da amostra e da técnica instrumental (ARAÚJO, 2009).

A abordagem mais eficiente para reduzir os efeitos da matriz é a eliminação dos componentes da amostra que são responsáveis pelos efeitos da matriz. Isto pode ser obtido através da otimização do pré-tratamento da amostra. As técnicas mais comumente utilizadas no pré-tratamento das amostras são: extração por precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração em membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas sendo as três primeiras mais utilizadas na rotina do laboratório (QUEIROZ *et al.*, 2001; SNYDER *et al.*, 1997; SAAR *et al.*, 2009)

### 2.8.2 Avaliação do efeito matriz

Moléculas originadas da mesma matriz da amostra, que co-eluem com o analito de interesse, podem interferir no processo de ionização na espectrometria de massas, causando supressão ou indução da ionização. Esse fenômeno é chamado de efeito matriz, o que pode limitar o uso de métodos bioanalíticos com detecção por espectrometria de massas. Portanto, uma avaliação da presença de efeito matriz deve ser incluída no processo de validação, embora muitas vezes seja negligenciada (EECKHAUT *et al.*, 2009; SAAR *et al.*, 2009).

O efeito matriz está relacionado com a grande complexidade e variabilidade de matrizes biológicas. Além de várias compostos endógenos comuns à bioquímica de todo ser vivo, as matrizes biológicas contêm metabólitos de fármacos de interesse e os co-administrados, excipientes da formulação, substâncias oriundas da dieta ou do

---



uso de suplementos, entre outros. A presença e/ou concentração dos componentes da matriz biológica podem variar de acordo com as características de cada indivíduo, como, por exemplo, a raça e o estado de saúde, e também de acordo com a ação farmacológica do fármaco de interesse ou dos co-administrados (JAMES, 2004).

## **2.9 Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de cloroquina e primaquina**

Na literatura científica, existem alguns trabalhos que apresentam métodos de quantificação de antimaláricos em formas farmacêuticas ou matrizes biológicas. Foram selecionados os estudos encontrados que quantificam antimaláricos em plasma. Alguns desses exemplos estão relacionados na **Tabela 4**.

Em relação aos estudos selecionados, é possível observar que é um assunto visado e objeto de pesquisa em vários laboratórios, devido ao grande número de trabalhos encontrados. Há uma ampla variedade de formas de detecção dos antimaláricos, por exemplo, KIM *et al.*(2004) utilizaram detecção eletroquímica, SAMANIDOU *et al.* (2005) e MAITLAND *et al.* (1997) utilizaram detecção por fluorescência, mas em sua maioria são usadas detecção na região do ultravioleta e por espectrometria de massas. A maioria das colunas são de fase reversa, com empacotamento de sílica gel ligada a grupos quirais ou octadecilsilano. As fases móveis, em sua maioria, apresentam acetonitrila e uma solução tampão, e trabalha-se com pH na faixa de 4,0 a 6,0, com exceção do método de YONEMITSU *et al.* (2005) e NOGUEIRA *et al.* (2011), cujo o pH de trabalho é na faixa de 3,4-3,5.

HODEL *et al.* (2009) desenvolveram um método bioanalítico para detecção de 14 antimaláricos por espectrometria de massas, porém somente a cloroquina foi estudada, a primaquina está ausente entre os antimaláricos selecionados. DUA *et al.* (1996) desenvolveram um método de determinação de primaquina e seus metabólitos em plasma humano, e compararam os fatores de retenção encontrados com o fator de retenção da cloroquina nas mesmas condições e concluíram que não

---

haveria interferências. DWIVEDI *et al.* (2009) desenvolveram um método de separação e doseamento da cloroquina, primaquina e bulaquina em comprimidos, mas não estudaram em matriz biológica. Tanto DUA *et al.*(1996) e DWIVEDI *et al.* (2009) utilizaram detecção na região do ultravioleta.

Não foram encontrados métodos na literatura científica que apresentasse método bioanalítico para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma ou em outras matrizes biológicas.

---

## Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

**Tabela 4 – Condições cromatográficas para quantificação de cloroquina e primaquina.**

<b>Referência</b>	<b>Fármaco(s)</b>	<b>Fase Móvel</b>	<b>Coluna</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Tempo de eluição (min)</b>	<b>Deteção</b>
AVULA <i>et al.</i> (2010)	PRI	Gradiente linear, acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico : solução aquosa de formato de amônio 0,02 M com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e pH 5,9	Chiracel OD, 250 x 4,6 mm, 10 µm	Precipitação de proteínas	Plasma de rato e humano	30	EM
BRONDZ <i>et al.</i> (2004)	PRI	Isocrática, mistura de metanol carbonato de amônio 0,2 M (75:2)	Adsorbosphere Nucleoside-Nucleoside, 250 x 4,6 mm, 7 µm.	-	Não-biológica	20	EM
DONGRE <i>et al.</i> (2008)	PRI	Isocrática, mistura de solução de ácido trifluoroacético 0,01% e acetonitrila (75:25)	Waters Acquity BEH C18, 50 x 2,1 mm; 1,7 µm	-	Não biológica	5	UV (265 nm)
DUA <i>et al.</i> (1996)	PRI	Isocrática, mistura de acetonitrila; metanol; ácido perclórico M, e água (30:9:1:95)	µBondapak C <sub>18</sub> , 300 x 3,9 mm, 5 µm	Extração líquido-líquido	Plasma e sangue humanos		UV (254 nm)
DUA <i>et al.</i> (1999)	CLO	Isocrática, mistura de cloreto de metileno, metanol e ácido perclórico M (100:9:1,2).	uPorasil Waters normal phase column, 300 x 3,9 mm, 5 µm.	Extração líquido-líquido	Plasma e sangue humanos	-	UV (343 nm) ou FLU (340 nm e 380 nm)
DWIVEDI <i>et al.</i> (2003)	CLO, PRI e bulaquina	Isocrática, mistura de tampão de acetato de sódio 0,01 M pH 5,6 e acetonitrila (45:55).	Lichrospher Merck RP select-B C <sub>8</sub> , 250 x 4,6 mm, 5 µm, 27± 3 °C.	-	Não-biológica	20	UV (265 nm)

## Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

Tabela 4 – (Continuação)

<b>Referência</b>	<b>Fármaco(s)</b>	<b>Fase Móvel</b>	<b>Coluna</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Tempo de eluição (min)</b>	<b>Deteção</b>
HODEL <i>et al.</i> (2009)	CLO e outros 13 antimaláricos	Gradiente, formato de amônio 0,02 M e acetonitrila, ambos com ácido fórmico 0,05% (v/v)	Waters Atlantis dC18, 50 x 2,1 mm, 3 µm, 25 °C	Precipitação de proteínas	Plasma humano	21	EM
KIM <i>et al.</i> (2004)	PRI	Isocrática, tampão fosfato 0,07 M pH 5,8 : edetato dissódico 1% (p/v) : acetonitrila (74,5:25:5)	Shodex ODSpak F-511 C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 5 µm, 40 °C	Precipitação de proteínas e extração em fase sólida	Plasma humano	30	EQ
MAGALHÃES <i>et al.</i> (2008)	CLO	Isocrática, mistura de metanol, acetonitrila, ácido acético glacial e dietilamina (90:10:0,5:0,5).	Chirobiotic V, 150 x 4,6 mm, 5 µm, 23± 2 °C.	Microextração em fase líquida	Plasma humano	12	EM
MAITLAND <i>et al.</i> (1997)	CLO	Isocrática, mistura de acetonitrila; metanol; e dietilamina (80:19,5:0,5).	Waters µPorasil, 300 x 3,9 mm, 10 µm.	Extração líquido-líquido	Plasma humano	8	FLUO (excitação: 335 nm; emissão: 370)
NITIN <i>et al.</i> (2003)	PRI	Isocrática, mistura de acetonitrila e tampão acetato de amônio 0,02 M pH 6,0 (50:50)	Duas colunas ciano de 30 x 4,6 mm, 5 µm, conectadas em série	Extração líquido-líquido	Plasma de macaco	10	EM
NOGUEIRA <i>et al.</i> (2011)	CLO, PRI, quinina e mefloquina	Isocrática, mistura de fosfato de potássio monobásico 0,05 M com pH ajustado para 3,5 e metanol (40:60)	Waters Xterra RP18, 250 x 4,6 mm; 5 µm	-	Não biológica	10	UV (283 nm)

## Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

Tabela 4 – (Continuação)

<b>Referência</b>	<b>Fármaco(s)</b>	<b>Fase Móvel</b>	<b>Coluna</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Matriz</b>	<b>Tempo de eluição (min)</b>	<b>Deteção</b>
SAMANIDOU <i>et al.</i> (2005)	CLO e quinina	Isocrática, mistura de metanol; acetonitrila; e acetato de amônio 0,1 mL/L (45:15:40)	Kromasil C18, 250 x 4 mm, 5 µm	Extração em fase sólida	Sangue e urina humanos	6	FLUO (excitação: 325 nm; emissão: 375)
SINGHAL <i>et al.</i> (2007)	CLO	Isocrática, tampão acetato de amônio 0,01 M pH 4,6: metanol (25:75)	Chromolith SpeedROD RP-18e, 50 x 4,6 mm	Precipitação de proteínas	Plasma canino	2	EM
THE UNITED (2011)	CLO	Isocrática, mistura de solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 13,6 g/L com pH ajustado para 2,5 e metanol (78:22)	Coluna de sílica quimicamente ligada a grupos C <sub>18</sub> , 100 x 4,6 mm; 1,5 a 10 µm	-	Não biológica	-	UV (224 nm)
THE UNITED (2011)	PRI	Isocrática, mistura de acetonitrila, tetraidrofurano, ácido trifluoroacético e água (9:1:0,1:90)	Coluna de sílica quimicamente ligada a grupos C <sub>8</sub> , 75 x 4,6 mm; 3 µm	-	Não biológica	-	UV (265 nm)
YONEMITSU <i>et al.</i> (2005)	CLO	Isocrática, mistura de acetonitrila e ácido 1-heptanossulfônico contendo 0,07% (v/v) de dietilamina e pH 3,4 ajustado com ácido fosfórico (30:70)	TSK gel Super-ODS, 100 x 4,6 mm, 40 °C	Extração líquido-líquido	Plasma humano	10	UV (254 nm)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar método bioanalítico para a quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos e em plasma humano.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de cloroquina e primaquina em comprimido por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).
  - Desenvolver e validar método analítico para quantificação de cloroquina e primaquina em comprimido por cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE).
  - Desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação de cloroquina e primaquina em plasma humano, por CLAE, com detecção por espectrometria de massas.
-

## **CAPÍTULO 2**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE  
CLOROQUINA E PRIMAQUINA EM COMPRIMIDOS**

---

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Fosfato de cloroquina SQR – fabricado por INCQS/Fiocruz. Lote Y2F01. Teor: 99,6%. Válido por todo o período de estudo.
- Fosfato de primaquina SQR – fabricado por INCQS/Fiocruz. Lote Z2F01. Teor: 99,7%. Válido por todo o período de estudo.
- Comprimidos de fosfato de cloroquina (150 mg de cloroquina base) – fabricado por Farmanguinhos/Fiocruz. Lote: 12080937. Validade: 08/2014.
- Comprimidos de fosfato de primaquina (15 mg de primaquina base) – fabricado por Farmanguinhos/Fiocruz. Lote: 12040391. Validade: 04/2014.

#### 1.1.2 Reagentes e Vidraria

- Reagente grau analítico: ácido fosfórico.
- Reagentes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol e trietilamina.
- Água destilada e deionizada em sistema Millipore.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, erlenmeyers e kit de filtração.

#### 1.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultra-som marca UNIQUE modelo 1400.
  - Balança analítica marca SARTORIUS modelo BP210D com precisão de 0,01 mg.
  - Coluna cromatográfica ACE<sup>®</sup> 5 C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 µm).
  - Coluna cromatográfica Thermo<sup>®</sup> Hypersil C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm).
  - Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Thermo<sup>®</sup> Acella, composto com bomba quartenária, auto-injetor, forno de colunas e acoplado a detector de arranjos de diodos (DAD).
-



- Estufa marca FANEM Orion 515.
- Pipetas calibradas marca BRAND.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus marca Millipore.
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos

Inicialmente, desenvolveu-se um método analítico para quantificação simultânea de comprimidos de cloroquina e de primaquina por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Posteriormente, o método analítico por CLAE seria transferido para cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE). A validação de ambos os métodos foi realizada de acordo com as especificações *Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### 1.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de cloroquina e primaquina

A solução padrão de cloroquina e de primaquina foi preparada pesando-se, inicialmente, exatamente cerca de 20,16 mg de fosfato de cloroquina SQR (corresponde a 12,50 mg de cloroquina base livre) transferido para balão volumétrico de 25 mL e completando-se o volume com diluente. O diluente utilizado foi uma mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1). Em um segundo balão volumétrico de 25 mL, pesaram-se exatamente cerca de 21,95 mg de fosfato de primaquina SQR (correspondente a 12,50 mg de primaquina base livre) e completou-se o volume com o mesmo diluente. Retirou-se uma alíquota de 3 mL da solução padrão estoque de cloroquina e de 2 mL da solução padrão estoque de primaquina para balão volumétrico de 10 mL e

---

completou-se o volume com o diluente. Ao final, obteve-se uma solução padrão de cloroquina a 0,15 mg/mL e primaquina a 0,10 mg/mL.

Para o preparo da solução amostra de cloroquina e primaquina, inicialmente determinou-se o peso médio de 20 comprimidos de cada um dos fármacos. O peso médio para os comprimidos de cloroquina foi de 407,78 mg e para os comprimidos de primaquina foi de 135,29 mg. A solução amostra de cloroquina e de primaquina foi preparada pesando-se, inicialmente, exatamente cerca de 0,08 pesos médios de pó do comprimido de difosfato de cloroquina (corresponde a cerca de 12,5 mg de cloroquina base livre) para balão volumétrico de 25 mL e completando-se o volume com diluente. Exatamente, cerca de 0,67 pesos médios de pó do comprimido de difosfato de primaquina (corresponde a cerca de 10,0 mg de primaquina base livre) foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com diluente. Retirou-se uma alíquota de 3 mL da solução amostra de cloroquina e de 5 mL da solução amostra de primaquina, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente. Ao final obteve-se uma solução amostra de cloroquina a 0,15 mg/mL e primaquina a 0,10 mg/mL.

### 1.2.3 Validação do método por cromatografia a líquido de alta eficiência

#### 1.2.3.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Thermo Acella provido de detector ultravioleta (DAD) a 260 nm e coluna ACE<sup>®</sup> 5 C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 25 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico, no modo gradiente segundo **Tabela 5**, e fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. O volume de injeção 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.

---

**Tabela 5 – Gradiente da corrida cromatográfica para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Tempo de corrida (min)</i>	<i>Composição da fase móvel (%)</i>	
	<i>Acetonitrila</i>	<i>Trietilamina 0,1% pH 3,0</i>
0,0	10,0	90,0
0,9	10,0	90,0
1,0	40,0	60,0
1,6	40,0	60,0
1,7	10,0	90,0
4,2	10,0	90,0

#### 1.2.3.2 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram preparadas três soluções padrão independentes e a partir delas obtiveram-se três curvas analíticas na faixa de 60% a 140% da concentração de trabalho para cada fármaco (0,10 mg/mL para a primaquina base livre e 0,15 mg/mL para a cloroquina base livre).

Inicialmente preparou-se, em triplicata, soluções mãe de fosfato de primaquina SQR e fosfato de cloroquina SQR, em balão volumétrico de 50 mL contendo 0,30 mg/mL de cloroquina base livre e 0,20 mg/mL de primaquina base livre, com o volume completado com diluente. A partir de cada solução mãe, foram feitas diluições para balão volumétrico de 10 mL em cinco diferentes concentrações, conforme **Tabela 6**.

**Tabela 6 – Soluções para construção da curva analítica e avaliação da linearidade do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Diluente: mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1).**

<i>Intervalo linear (%)</i>	<i>Volume da solução mãe (mL)</i>	<i>Concentração de cloroquina base livre (mg/mL)</i>	<i>Concentração de primaquina base livre (mg/mL)</i>	<i>Diluente q. s. p. (mL)</i>
60	3,0	0,09	0,06	10
80	4,0	0,12	0,08	10
100	5,0	0,15	0,10	10
120	6,0	0,18	0,12	10
140	7,0	0,21	0,14	10

A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados, por meio da estimativa dos parâmetros coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a).

#### 1.2.3.3 Precisão

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho para cada fármaco (0,10 mg/mL para a primaquina base livre e 0,15 mg/mL para a cloroquina base livre). As soluções amostra e padrão para a análise foram preparadas conforme procedimento descrito no item 1.2.2. Para avaliação da precisão inter-corrídas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. Os teores de cloroquina e primaquina e o desvio padrão relativo (DPR) dos valores foram determinados.

#### 1.2.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada segundo o procedimento de adição de padrão. Foram preparadas nove soluções amostras independentes contendo cerca de 0,075 pesos médios de comprimidos de fosfato de cloroquina e 0,5 pesos médios de comprimidos de fosfato de primaquina para balão volumétrico de 25 mL e

solubilizados com diluente. Também foi preparada uma solução padrão contendo 0,30 mg/mL de cloroquina base livre e 0,20 mg/mL de primaquina base livre em balão volumétrico de 25 mL, em diluente.

Adicionaram-se alíquotas da solução padrão às soluções amostras de acordo com a **Tabela 7**. Obteve-se a triplicata de três concentrações dentro da faixa linear para os dois fármacos.

**Tabela 7 – Soluções para avaliação da exatidão do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Diluente: mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1).**

%	Volume adicionado de solução amostra (mL)	Concentração da solução amostra (mg/mL)		Volume adicionado de solução padrão (mL)	Concentração final (mg/mL)		Diluente q. s. p. (mL)
		CLO	PRI		CLO	PRI	
80	5,0	0,09	0,06	1,0	0,12	0,08	10
100	5,0	0,09	0,06	2,0	0,15	0,10	10
120	5,0	0,09	0,06	3,0	0,18	0,12	10

As porcentagens de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados para cada fármaco.

#### 1.2.3.5 Seletividade

A seletividade do método por CLAE foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos de cloroquina e primaquina obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, nas concentrações de trabalho, com auxílio do detector DAD.

#### 1.2.3.6 Robustez

Uma solução padrão e quatro soluções amostras independentes foram preparadas de acordo com o procedimento descrito em 1.2.2 e analisadas nas condições

nominais e variando-se os seguintes parâmetros analíticos: proporção de acetonitrila na fase móvel, pH aparente da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. As variações estabelecidas para cada parâmetro estão demonstradas na **Tabela 8**.

**Tabela 8 – Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Variação</i>	<i>Valor inferior</i>	<i>Valor nominal</i>	<i>Valor superior</i>
Proporção de ACN na FM (%)	± 2,0	8,0 – 38,0	10,0 – 40,0	12,0 – 42,0
pH aparente da FM	± 0,3	2,7	3,0	3,3
Fluxo da FM (mL/min)	- 0,1	0,9	1,0	-
Temperatura da coluna (°C)	± 2,0	23,0	25,0	27,0

Em cada condição, os teores de cloroquina e primaquina foram determinados e os valores obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por meio de análise de variância (ANOVA).

#### 1.2.3.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de cloroquina e primaquina foram inicialmente estimados a partir das equações que leva em consideração parâmetros da curva analítica, apresentada no item 1.2.3.2. As equações foram preconizadas pelo ICH (INTERNACIONAL, 2005) e estão representadas a seguir:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Em que:

- $\sigma$  corresponde ao desvio padrão da resposta na curva analítica.
- $S$  é o valor da inclinação da curva analítica.

## 1.2.4 Validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência

## 1.2.4.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Thermo Acella provido de detector ultravioleta (DAD) a 260 nm e coluna Thermo Hypersil® C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm), mantida a 25 °C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico no modo gradiente segundo **Tabela 9**, fluxo de fase móvel de 600 µL/min. O volume de injeção foi 7,0 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. O diluente utilizado para solubilizar os padrão e amostras de cloroquina e primaquina foi uma mistura de metanol e solução de trietilamina a 0,1% (v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (1:1).

**Tabela 9 – Gradiente da corrida cromatográfica para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Tempo de corrida (min)</i>	<i>Composição da fase móvel (%)</i>	
	<i>Acetonitrila</i>	<i>Trietilamina 0,1% pH 3,0</i>
0,00	10,0	90,0
0,45	10,0	90,0
0,47	40,0	60,0
1,20	40,0	60,0
1,30	10,0	90,0
4,00	10,0	90,0

## 1.2.4.2 Parâmetros de validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência

Para validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência, foram avaliados os mesmos parâmetros previamente descritos para o método por cromatografia a líquido de alta eficiência: linearidade, precisão, exatidão,

seletividade, robustez, limites de detecção e quantificação. Os procedimentos para preparo e diluição das soluções padrão e amostra, assim como a forma como parâmetro foi avaliado, estão descritos nos itens 1.2.3.2 a 1.2.3.7.

#### 1.2.5 Comparação entre os métodos por CLAE e por CLUE para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos

O método de quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE foi comparado ao método de quantificação por CLUE. Para isso, comprimidos de cloroquina e primaquina foram analisados, em sextuplica, em dois dias consecutivos, por CLAE e por CLUE. As médias dos teores de cada fármaco estimadas por CLAE e CLUE foram comparadas por meio do teste *t* de *student* ( $\alpha=0,05$ ). Além disso, os métodos foram comparados em relação ao tempo de análise e gasto de solvente.

---



## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos

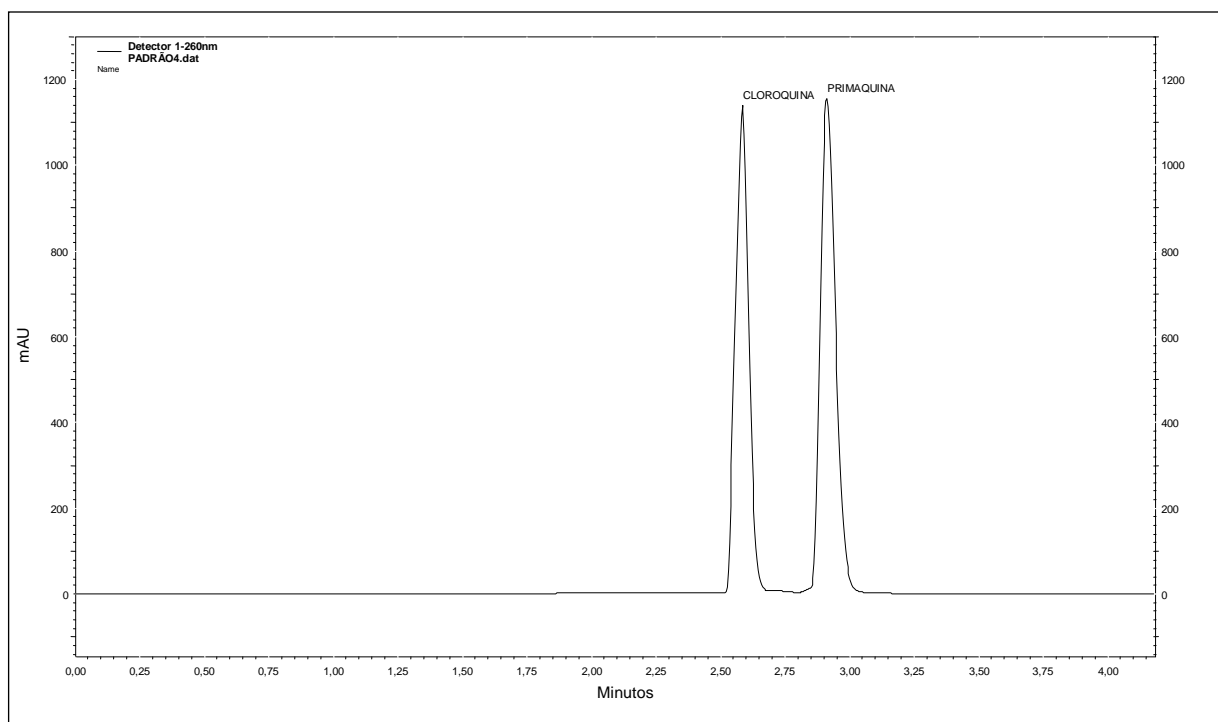
Na literatura científica não foram encontradas descrições de métodos com o objetivo de quantificar simultaneamente cloroquina e primaquina em comprimidos. Na Farmacopeia Americana 34<sup>a</sup> edição (THE UNITED, 2011), é sugerido o uso de CLAE para quantificar a cloroquina e a primaquina em comprimidos, mas os métodos descritos são muito diferentes, principalmente em relação a composição da fase móvel e especificação da coluna cromatográfica. NOGUEIRA *et al* (2011) avaliou a seletividade do método analítico desenvolvido para quantificação de mefloquina injetando simultaneamente cloroquina, primaquina, quinina e mefloquina. As condições cromatográficas utilizadas foram fase móvel constituída da mistura de metanol e tampão de fosfato de potássio monobásico 0,05 M pH 3,5 (60:40), corrida cromatográfica no modo isocrático, fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min, detecção por espectrometria no ultravioleta no comprimento de onda de 283 nm e coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm). Segundo representação do cromatograma da corrida nessas condições, o método apresenta uma boa resolução entre os picos da cloroquina e da primaquina e um tempo de corrida inferior a cinco minutos. Utilizando-se o método descrito, porém com o uso de uma coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 µm), obteve-se uma retenção muito baixa para a cloroquina, sendo necessário diminuir a porcentagem do solvente orgânico na composição da fase móvel. Como o objetivo posterior era a transferência do método por CLAE para o por CLUE, decidiu-se, também, substituir o uso de tampão fosfato por uma solução de trietilamina com pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico, e assim reduzir a probabilidade de entupimentos, pois em sistemas de CLUE os tamanhos dos poros e junções do equipamento são menores e tampões fosfato podem apresentar precipitação de sais. Com as alterações das condições cromatográficas, o tempo de corrida aumentou para mais de quatro minutos e houve alargamento do pico da primaquina. Decidiu-se usar o modo gradiente para eluição, a fim de se aumentar a retenção do pico de cloroquina, sem prejudicar tanto a retenção do pico de primaquina. Optou-se

---

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

pelo uso de acetonitrila em detrimento ao metanol na composição da fase móvel, tendo em vista que o uso de um solvente orgânico com maior capacidade eluente diminuiu o tempo de retenção e o alargamento do pico da primaquina. Por fim, o pH aparente da fase móvel foi reduzido para 3,0, pois houve melhora na simetria dos picos dos fármacos, principalmente para a cloroquina. A condição cromatográfica por CLAE desenvolvida e validada está descrita no item 1.2.3.1 e o cromatograma está representado na **Figura 6**. O tempo de corrida total foi de 4,20 minutos; o tempo de retenção (Tr) do pico da cloroquina foi de cerca de 2,60 minutos e de 2,95 minutos para o pico da primaquina.

**Figura 6** – Cromatograma representativo do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE. Condições cromatográficas: fase móvel em gradiente de (A)acetonitrila:(B)solução de trietilamina a 0,1% pH ajustado para 3,0 (0-0,9 min:10%A; 0,9-1,0 min:10-40%A; 1,0-1,6 min:40%A; 1,6-1,7 min: 40-10%A; 1,7-4,2 min:10%A) fluxo de 1,0 mL/min, coluna C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm) a 25 °C, detector a 260 nm.



Para a transferência do método por CLAE para o método por CLUE, utilizou-se a metodologia sugerida por GUILLARME *et al* (2008) para corridas em modo gradiente, na qual por meio de equações matemáticas é possível calcular as novas

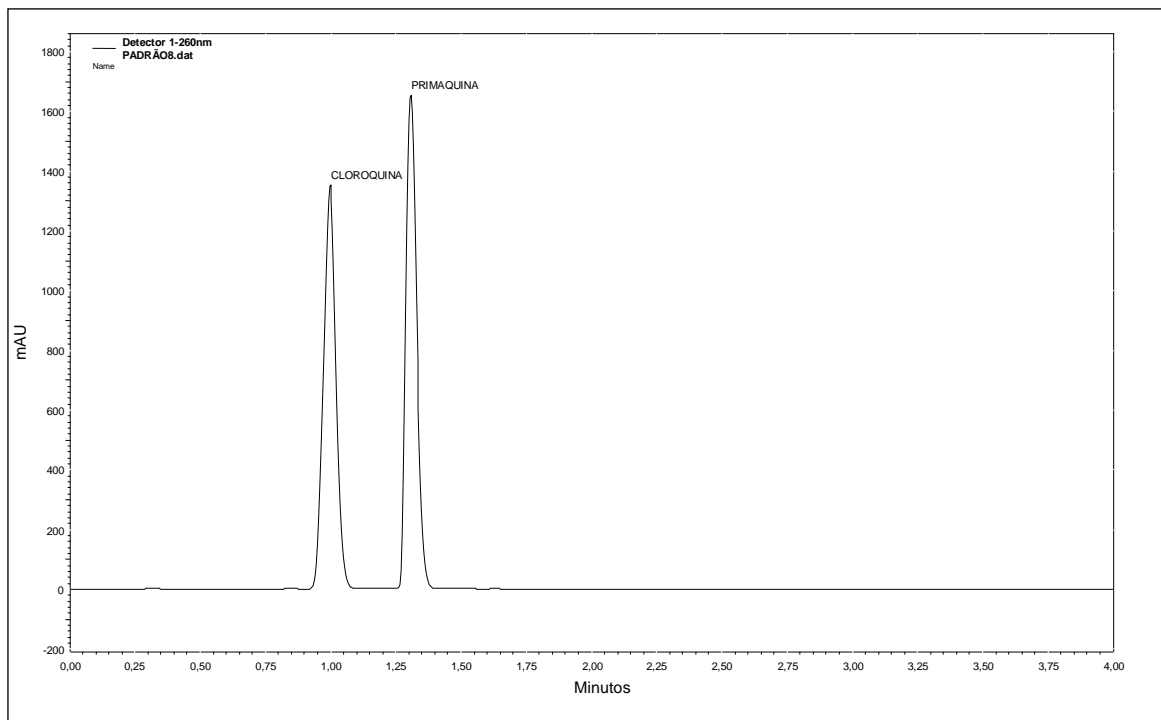
condições cromatográficas para CLUE, como fluxo da fase móvel e volume de injeção. Além disso, pode-se prever o tempo de corrida e a pressão do sistema do novo método. A coluna analítica utilizada foi uma C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm) para cromatografia a líquido de ultra eficiência. O resultado da transferência foi insatisfatório, com baixa resolução entre os picos, baixa retenção do pico da cloroquina, assimetria elevada e perda no sinal dos picos, principalmente pelo baixo volume de injeção sugerido na transferência. Houve necessidade de mudanças no tempo do gradiente, no volume de injeção e no tempo de acondicionamento, conforme representado na **Tabela 10**.

**Tabela 10** – Alterações realizadas na otimização da transferência do método de CLAE para CLUE.

<i>Condições sugeridas</i>			<i>Condições otimizadas</i>		
<i>Volume de injeção (µL)</i>		1,0	<i>Volume de injeção (µL)</i>		7,0
<i>Tempo de corrida (min)</i>	<i>Composição da fase móvel (%)</i>		<i>Tempo de corrida (min)</i>	<i>Composição da fase móvel (%)</i>	
	<i>Acetonitrila</i>	<i>Trietilamina 0,1% pH 3,0</i>		<i>Acetonitrila</i>	<i>Trietilamina 0,1% pH 3,0</i>
0,00	10,0	90,0	0,00	10,0	90,0
0,16	10,0	90,0	0,45	10,0	90,0
0,17	40,0	60,0	0,47	40,0	60,0
0,28	40,0	60,0	1,20	40,0	60,0
0,30	10,0	90,0	1,30	10,0	90,0
0,73	10,0	90,0	4,00	10,0	90,0

A condição cromatográfica por CLUE desenvolvida e otimizada está descrita no item 1.2.4.1 e o cromatograma está representado na **Figura 7**. O tempo de corrida total foi de 4,00 minutos; os tempos de retenção (Tr) dos picos da cloroquina e da primaquina foram 1,00 minuto e 1,30 minuto, respectivamente.

**Figura 7 – Cromatograma representativo do método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE. Condições cromatográficas: fase móvel em gradiente de (A)acetonitrila:(B)solução de trietilamina a 0,1% pH ajustado para 3,0 (0-0,45 min:10%A; 0,45-0,47 min:10-40%A; 0,47-1,20 min:40%A; 1,20-1,30 min: 40-10%A; 1,30-4,00 min:10%A) fluxo de 600 µL/min, coluna C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,9 µm) a 25 °C, detector a 260 nm.**



## 2.2 Validação do método por cromatografia a líquido de alta eficiência

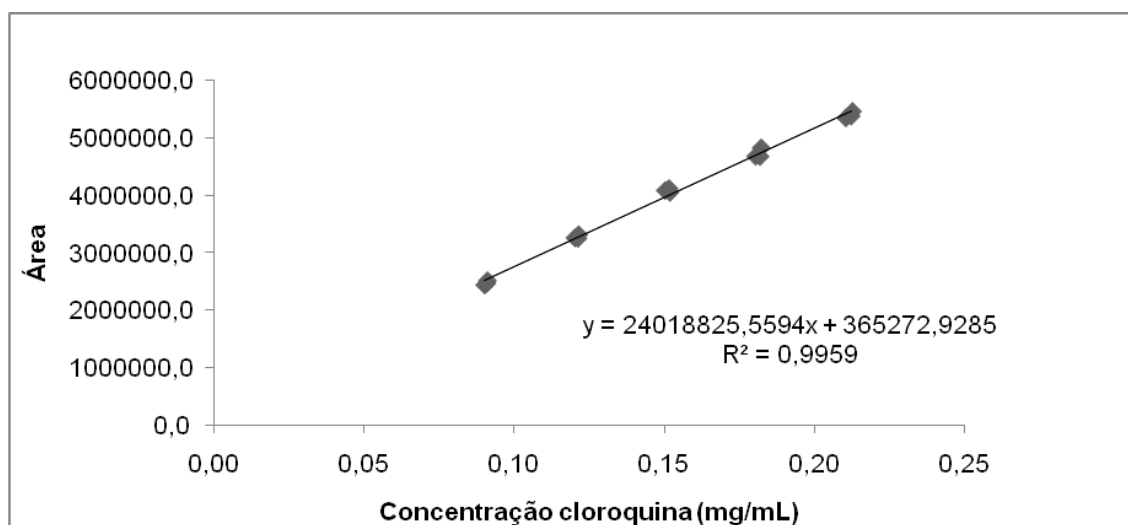
### 2.2.1 Linearidade

A curva analítica obtida para o método por CLAE indicou correlação linear adequada entre as concentrações de cloroquina e as áreas dos picos, na faixa de 0,09 mg/mL a 0,21 mg/mL. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na **Tabela 11** e na **Figura 8**.

**Tabela 11 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9959
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,9980
Inclinação $\pm$ erro padrão	24018825 $\pm$ 427200
Intercepto $\pm$ erro padrão	365272 $\pm$ 67140
Desvio padrão da resposta da curva analítica	70780
Faixa de concentração (mg/mL)	0,09 – 0,21
Número de pontos	15

**Figura 8 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE.**

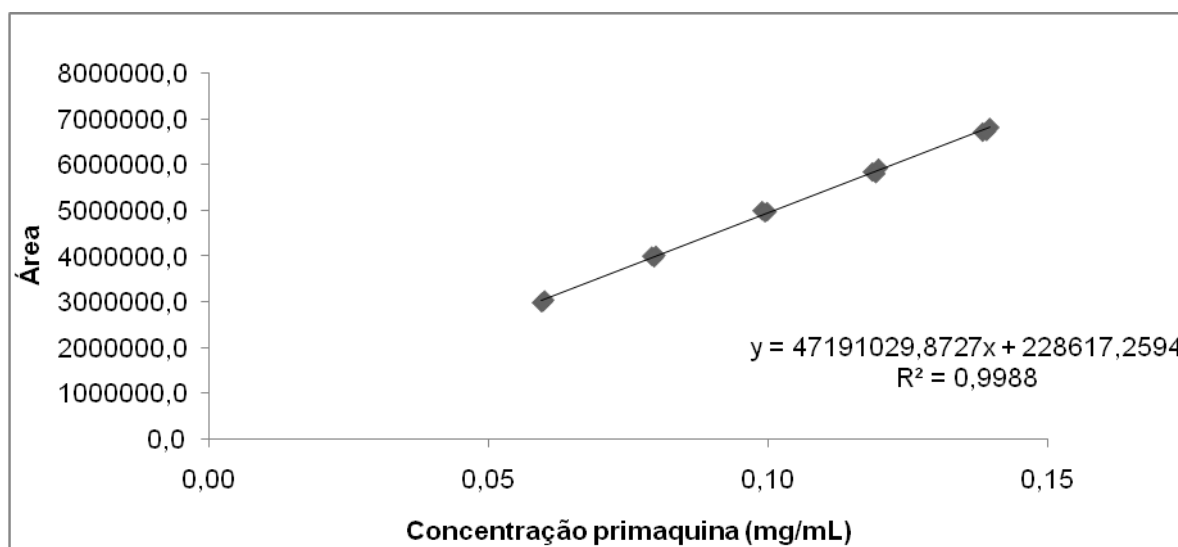


A curva analítica obtida para o método por CLAE indicou correlação linear adequada entre as concentrações de primaquina e as áreas dos picos, na faixa de 0,06 mg/mL a 0,14 mg/mL. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na **Tabela 12** e no **Figura 9**.

**Tabela 12 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9988
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,9994
Inclinação $\pm$ erro padrão	47191029 $\pm$ 440800
Intercepto $\pm$ erro padrão	228617 $\pm$ 45520
Desvio padrão da resposta da curva analítica	48010
Faixa de concentração (mg/mL)	0,06 – 0,14
Número de pontos	15

**Figura 9 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLAE.**



### 2.2.2 Precisão

A precisão intra-corrída e inter-corrídas do método por CLAE foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho para os dois fármacos (0,10 mg/mL para a primaquina base livre e 0,15 mg/mL para a cloroquina base livre). Os valores de DPR obtidos nas análises da cloroquina para a precisão intra-corrída ( $n=6$ ) e inter-corrídas ( $n=12$ ) foram 1,10% e 1,59%, respectivamente. Os

valores de DPR obtidos nas análises da primaquina para a precisão intra-corrída ( $n=6$ ) e inter-corrídas ( $n=12$ ) foram 0,31% e 1,21%, respectivamente. Assim, a precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR abaixo de 2,0%. Os resultados obtidos no ensaio de precisão estão descritos na **Tabela 13**.

**Tabela 13 – Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Dia</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Teor de cloroquina (%)</i>	<i>Teor de primaquina (%)</i>
<b>1º</b>	1	100,26	99,71
	2	99,87	99,81
	3	99,30	99,67
	4	101,48	99,91
	5	102,25	99,04
	6	101,19	99,60
<b>2º</b>	7	99,86	96,11
	8	96,83	99,67
	9	99,72	98,09
	10	102,05	97,46
	11	98,94	98,31
	12	98,23	98,07
	<b>Média (%)</b>	<b>100,00</b>	<b>98,79</b>
	<b>DPR (%)</b>	<b>1,59</b>	<b>1,21</b>

### 2.2.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, em três níveis de concentração, cada um em triplicata. As porcentagens de recuperação de cada método estão demonstradas na **Tabela 14**. 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 de cloroquina e primaquina em comprimidos.

**Tabela 14 – Resultados da avaliação da exatidão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLAE.**

<i>Cloroquina</i>		<i>Primaquina</i>	
<i>Concentração teórica (mg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração teórica (mg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
0,12	99,38	0,08	97,77
	98,40		99,10
	99,92		100,19
0,15	101,88	0,10	97,73
	101,76		97,02
	101,57		98,53
0,18	98,56	0,12	98,21
	97,04		97,04
	99,96		97,35
<b>Média (%)</b>	<b>99,83</b>	<b>Média (%)</b>	<b>98,11</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,68</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>1,04</b>

#### 2.2.4 Seletividade

A determinação da pureza espectral dos picos cromatográficos de cloroquina e primaquina foi realizada com auxílio do detector de arranjo de diodos. As purezas dos picos referentes à cloroquina padrão e comprimidos foram, respectivamente, 99,20% e 99,37%. As purezas dos picos referentes à primaquina padrão e comprimidos foram, respectivamente, 97,71% e 95,56%. Os elevados valores de pureza de pico obtidos indicam que outros compostos não co-eluíram com os picos de interesse.



### 2.2.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e cuidados devem ser incluídos no procedimento.

Os resultados de teor e tempo de retenção para os picos dos fármacos nas diferentes condições analisadas estão representados na **Tabela 15**. Como o fluxo máximo permitido pelo cromatógrafo é de 1,0 mL/minuto, não foi possível a avaliação da robustez do método para valores de fluxo de fase móvel acima do valor nominal estabelecido para o método por CLAE.

A análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias utilizando o teste de Tukey não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre o resultado obtido nas condições nominais descritas no item 1.2.3.1 e os resultados obtidos em cada uma das condições avaliadas.

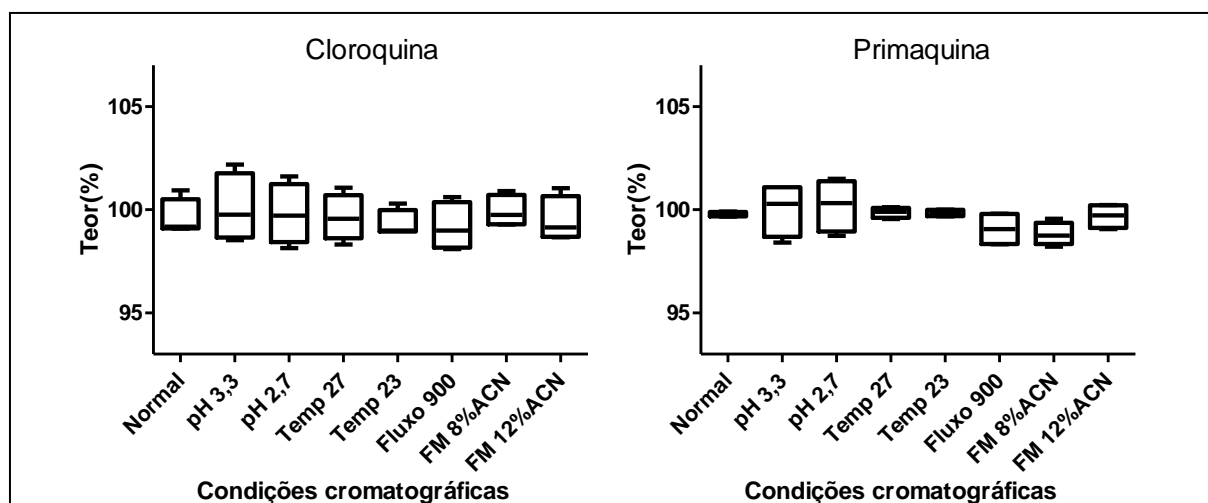
---

**Tabela 15 – Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE.**

Condição	Cloroquina			Primaquina		
	Teor médio (%)	DPR (%)	Tr médio (min)	Teor médio (%)	DPR (%)	Tr médio (min)
Nominal	99,59	0,90	2,58	99,77	0,11	2,92
Temperatura do forno a 23°C	99,31	0,67	2,60	99,84	0,17	2,93
Temperatura do forno a 27°C	99,63	1,13	2,59	99,87	0,26	2,92
Fluxo a 0,9 mL/min	99,17	1,18	2,69	99,06	0,84	3,06
8-38% de ACN na FM	99,92	0,77	2,60	98,82	0,56	3,10
12-42% de ACN na FM	99,49	1,10	2,56	99,68	0,60	2,77
pH aparente de 2,7 da FM	99,80	1,46	2,58	100,22	1,28	2,87
pH aparente de 3,3 da FM	100,06	1,65	2,58	100,02	1,31	2,97

A **Figura 10** representa a variação dos teores obtida nas diferentes condições para as amostras analisadas.

**Figura 10 – Resultados dos teores na avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE.**



### 2.2.6 Limites de detecção e quantificação

O valor encontrado para o desvio padrão da resposta da curva analítica para a cloroquina foi de 70780. Aplicando-se as equações descritas no item 2.1.3.7, o limite de detecção encontrado foi de 0,0097 mg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 0,0295 mg/mL.

Para a primaquina, o desvio padrão da resposta da curva analítica foi de 48010. Aplicando-se as equações, o limite de detecção encontrado foi de 0,0034 mg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 0,0102 mg/mL.

## 2.3 Validação do método por cromatografia a líquido de ultra eficiência

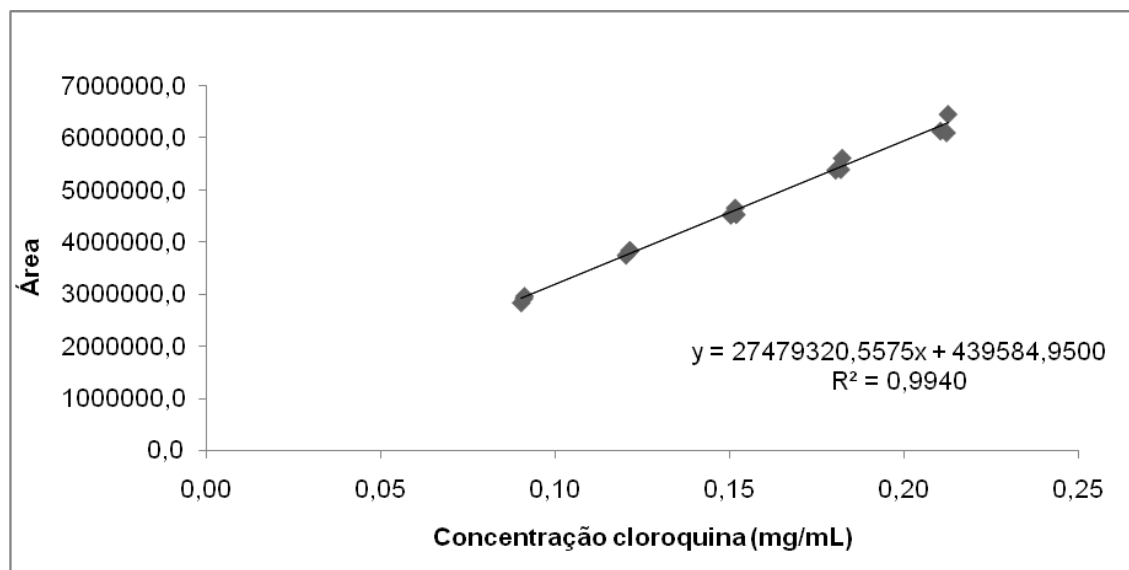
### 2.3.1 Linearidade

A curva analítica obtida para o método por CLUE indicou correlação linear adequada entre as concentrações de cloroquina e as áreas dos picos, na faixa de 0,09 mg/mL a 0,21 mg/mL. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na **Tabela 16** e na **Figura 11**.

**Tabela 16 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9940
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,9970
Inclinação $\pm$ erro padrão	27479320 $\pm$ 591000
Intercepto $\pm$ erro padrão	439584 $\pm$ 92890
Desvio padrão da resposta da curva analítica	97930
Faixa de concentração (mg/mL)	0,09 – 0,21
Número de pontos	15

**Figura 11 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE.**

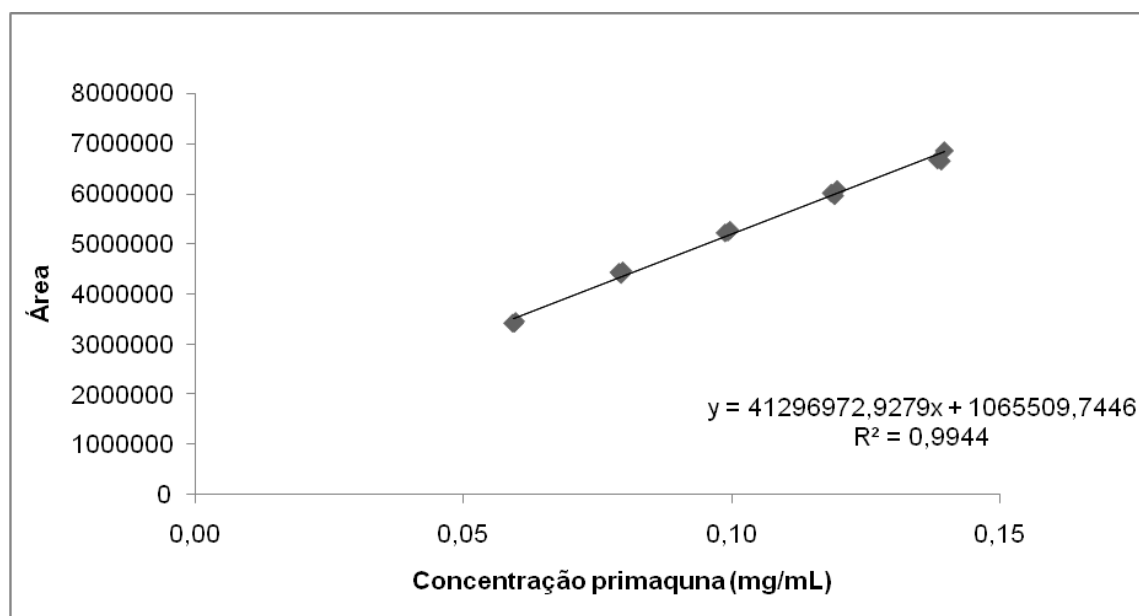


A curva analítica obtida para o método por CLUE indicou correlação linear adequada entre as concentrações de primaquina e as áreas dos picos, na faixa de 0,06 mg/mL a 0,14 mg/mL. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na **Tabela 17** e na **Figura 12**.

**Tabela 17 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9944
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,9972
Inclinação $\pm$ erro padrão	41296972 $\pm$ 860900
Intercepto $\pm$ erro padrão	1065509 $\pm$ 88890
Desvio padrão da resposta da curva analítica	93970
Faixa de concentração (mg/mL)	0,06 – 0,14
Número de pontos	15

**Figura 12 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de primaquina em comprimidos por CLUE.**



### 2.3.2 Precisão

A precisão intra-corrída e inter-corrídas do método por CLUE foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho para os dois fármacos (0,10 mg/mL para a primaquina base livre e 0,15 mg/mL para a cloroquina base livre). Os valores de DPR obtidos nas análises da cloroquina para a precisão intra-corrída ( $n=6$ ) e inter-corrídas ( $n=12$ ) foram 1,10% e 1,49%, respectivamente. Os valores de DPR obtidos nas análises da primaquina para a precisão intra-corrída ( $n=6$ ) e inter-corrídas ( $n=12$ ) foram 1,04% e 1,05%, respectivamente. Assim, a precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR abaixo de 2,0%. Os dados da análise de precisão estão demonstrados na **Tabela 18**

**Tabela 18 – Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Dia</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Teor de cloroquina (%)</i>	<i>Teor de primaquina (%)</i>
1º	1	100,98	100,55
	2	100,18	99,54
	3	98,90	97,85
	4	98,61	98,40
	5	98,01	99,52
	6	99,57	97,97
2º	7	101,23	101,14
	8	100,42	99,53
	9	96,48	98,90
	10	97,33	99,75
	11	98,25	99,51
	12	99,81	97,96
	<b>Média (%)</b>	<b>99,15</b>	<b>99,22</b>
	<b>DPR (%)</b>	<b>1,49</b>	<b>1,05</b>

### 2.3.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, em três níveis de concentração, cada um em triplicata. As porcentagens de recuperação de cada método estão demonstradas na **Tabela 19**. Os valores de porcentagem de recuperação próximos a 100% e desvio padrão relativo abaixo de 2,0% indicam que ambos os métodos apresentaram exatidão adequada para quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos.

**Tabela 19 – Resultados da avaliação da exatidão para o método de quantificação de cloroquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Cloroquina</i>		<i>Primaquina</i>	
<i>Concentração teórica (mg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração teórica (mg/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
0,12	99,22	0,08	101,34
	96,49		101,94
	101,33		101,99
0,15	99,09	0,10	99,52
	99,69		98,91
	97,21		99,63
0,18	98,59	0,12	97,87
	100,12		97,71
	101,23		98,16
<b>Média (%)</b>	<b>99,22</b>	<b>Média (%)</b>	<b>99,67</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,65</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>1,71</b>

#### 2.3.4 Seletividade

A determinação da pureza espectral dos picos cromatográficos de cloroquina e primaquina foi realizada com auxílio do detector de arranjo de diodos. As purezas dos picos referentes à cloroquina padrão e comprimidos foram, respectivamente, 98,32% e 98,17%. As purezas dos picos referentes à primaquina padrão e comprimidos foram, respectivamente, 99,95% e 97,69%. Os elevados valores de pureza de pico obtidos indicam que outros compostos não co-eluíram com os picos de interesse.

## 2.3.5 Robustez

Os resultados de teor e tempo de retenção para os picos dos fármacos nas diferentes condições analisadas estão representados na **Tabela 20**. A análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias utilizando o teste de Tukey não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre o resultado obtido nas condições nominais descritas no item 1.2.4.1 e os resultados obtidos em cada uma das condições avaliadas.

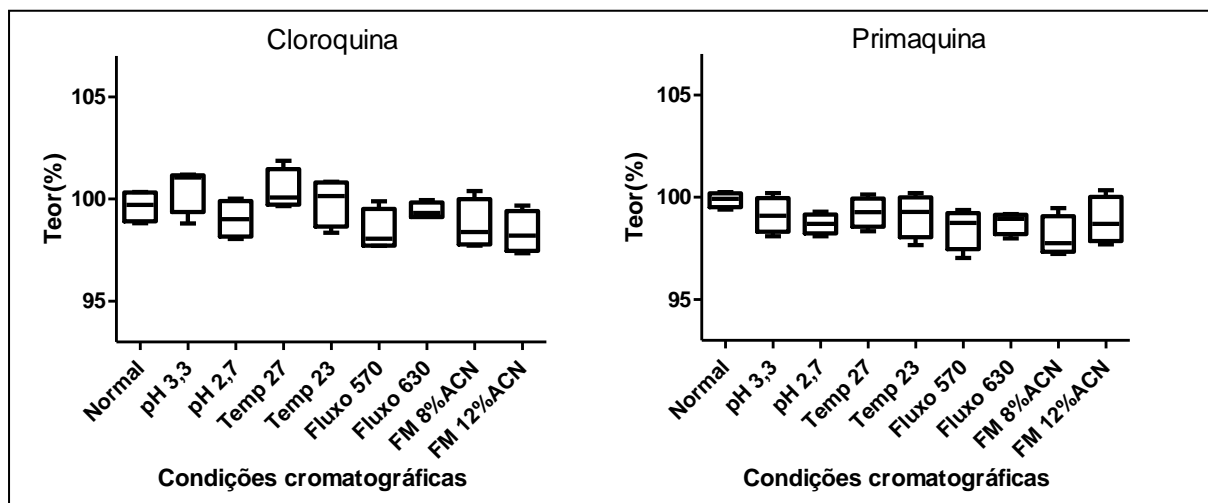
A **Figura 13** representa a variação de teores obtida nas diferentes condições para as amostras analisadas.

**Tabela 20 – Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE.**

<i>Condição</i>	<i>Cloroquina</i>			<i>Primaquina</i>		
	<i>Teor médio (%)</i>	<i>DPR (%)</i>	<i>Tr médio (min)</i>	<i>Teor médio (%)</i>	<i>DPR (%)</i>	<i>Tr médio (min)</i>
<b>Normal</b>	99,65	0,77	1,00	99,87	0,36	1,31
<b>Temperatura do forno a 23°C</b>	99,97	1,17	1,01	99,11	1,07	1,33
<b>Temperatura do forno a 27°C</b>	100,42	0,99	0,99	99,26	0,74	1,31
<b>Fluxo a 570 µL/min</b>	98,43	1,04	1,03	98,48	1,02	1,35
<b>Fluxo a 630 µL/min</b>	99,42	0,40	0,98	98,77	0,54	1,27
<b>8-38% de ACN na FM</b>	98,72	1,22	1,08	98,05	1,00	1,45
<b>12-42% de ACN na FM</b>	98,36	1,04	0,73	98,86	1,15	1,27
<b>pH aparente de 2,7 da FM</b>	99,02	0,92	1,01	98,69	0,50	1,28
<b>pH aparente de 3,3 da FM</b>	100,53	1,15	1,02	99,12	0,88	1,34



**Figura 13** – Resultados dos teores na avaliação da robustez para o método de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLUE.



### 2.3.6 Limites de detecção e quantificação

O valor encontrado para o desvio padrão da resposta da curva analítica para a cloroquina foi de 97930. Aplicando-se as equações descritas no item 2.1.3.7, o limite de detecção encontrado foi de 0,0118 mg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 0,0356 mg/mL.

Para a primaquina, o desvio padrão da resposta da curva analítica foi de 93970. Aplicando-se as equações descritas no item 2.1.3.7, o limite de detecção encontrado foi de 0,0075 mg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 0,0223 mg/mL.

## 2.4 Comparação entre os métodos por CLAE e por CLUE para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos

As médias dos teores de cada fármaco estimadas por CLAE e CLUE foram comparadas por meio do teste *t* de *student* ( $\alpha=0,05$ ). Os resultados dos teores estão representados na **Tabela 21**.

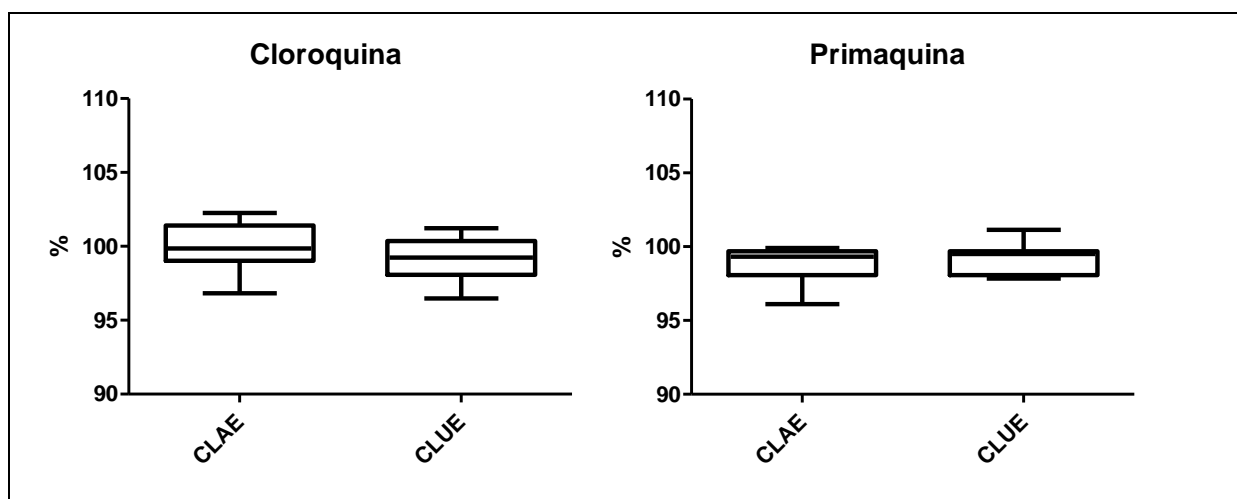
**Tabela 21 – Comparação dos resultados de quantificação simultânea de cloroquina e primaquina por CLAE e CLUE.**

<i>Dias</i>	<i>Teores obtidos para cloroquina (%)</i>		<i>Teores obtidos para primaquina (%)</i>	
	<i>CLAE</i>	<i>CLUE</i>	<i>CLAE</i>	<i>CLUE</i>
<b>1º</b>	100,26	100,98	99,71	100,55
	99,87	100,18	99,81	99,54
	99,3	98,9	99,67	97,85
	101,48	98,61	99,91	98,4
	102,25	98,01	99,04	99,52
	101,19	99,57	99,6	97,97
<b>2º</b>	99,86	101,23	96,11	101,14
	96,83	100,42	99,67	99,53
	99,72	96,48	98,09	98,9
	102,05	97,33	97,46	99,75
	98,94	98,25	98,31	99,51
	98,23	99,81	98,07	97,96
<b>Média</b>	<b>99,99</b>	<b>99,15</b>	<b>98,79</b>	<b>99,22</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,59</b>	<b>1,49</b>	<b>1,21</b>	<b>1,05</b>

Em seguida, foi aplicado o teste *t* de *student* ( $\alpha=0,05$ ), com objetivo de identificar as médias diferentes dentro de cada grupo. As médias obtidas por CLAE e CLUE foram estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ) tanto para os resultados da cloroquina quanto os da primaquina. De modo que os dois testes foram estatisticamente equivalentes.

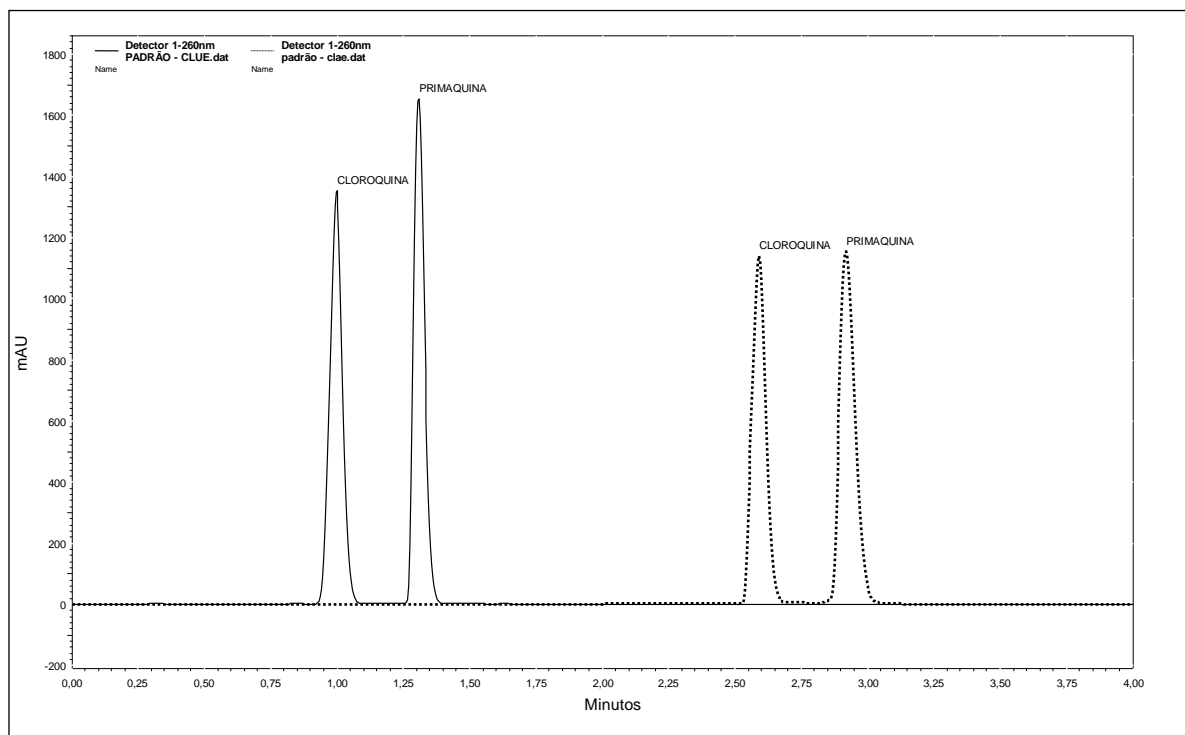
A **Figura 14** representa a variação dos teores, em porcentagem, obtidos no doseamento de cloroquina e primaquina por CLAE e CLUE.

**Figura 14** – Resultados dos teores, em porcentagem, na comparação dos métodos de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE e CLUE.



Dentre os métodos avaliados, o por CLUE apresentou menor tempo de retenção para os picos de cloroquina e primaquina em relação ao método por CLAE, conforme representado na **Figura 15**. Apesar do tempo de corridas cromatográficas normalmente ser inferior nos métodos por CLUE, comparando-se à CLAE, no presente trabalho não se observou diferença significativa entre os tempos de corrida dos métodos, uma vez que foi necessário a utilização de eluição em gradiente e o tempo para o acondicionamento da coluna de CLUE foi superior.

**Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas representativos dos métodos de quantificação de cloroquina e primaquina em comprimidos por CLAE (linha pontilhada) e por CLUE (linha contínua).**



Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o gasto de solvente para realização do teste. Mesmo com tempos de corrida próximos, o gasto de solvente no método por CLUE é consideravelmente menor, comparando-se ao CLAE, pois o fluxo de fase móvel é menor.

Apesar das vantagens inerentes à CLUE, seus equipamentos e colunas cromatográficas são mais caros, aumentando o custo da análise. Além disso, as colunas cromatográficas de CLUE, com tamanhos de partículas reduzidos, normalmente apresentam vida útil menor, por serem submetidas a pressões extremamente elevadas.

### 3 CONCLUSÃO

- Um método por CLAE em fase reversa, modo gradiente e detecção por arranjo de diodos (DAD) foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos. O método se demonstrou seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 0,09 mg/mL a 0,21 mg/mL para a cloroquina e na faixa de 0,06 mg/mL a 0,14 mg/mL para a primaquina.
  
  - Um método por CLUE em fase reversa, modo gradiente e detecção por arranjo de diodos (DAD) foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos. O método se demonstrou seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 0,09 mg/mL a 0,21 mg/mL para a cloroquina e na faixa de 0,06 mg/mL a 0,14 mg/mL para a primaquina.
  
  - Os métodos desenvolvidos apresentam-se como uma alternativa viável em relação aos métodos cromatográficos propostos pela Farmacopeia Americana, podendo ser utilizado no controle de qualidade dos produtos.
  
  - Este estudo contribui para a disponibilização de métodos rápidos, simples e viáveis para auxiliar a garantir a qualidade do produto acabado e a eficácia do tratamento com cloroquina e primaquina comprimidos.
-

## **CAPÍTULO 3**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
BIOANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE  
CLOROQUINA E PRIMAQUINA EM PLASMA HUMANO**

---

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Fosfato de cloroquina SQR – fabricado por INCQS/Fiocruz. Lote Y2F01. Teor: 99,6%.
- Fosfato de primaquina SQR – fabricado por INCQS/Fiocruz. Lote Z2F01. Teor: 99,7%.
- Cloridrato de amodiaquina SQR – fabricado pela USP Pharmacopea. Lote: JOI144. Teor: 99,9%.
- Comprimidos de fosfato de cloroquina (150 mg de cloroquina base) – fabricado por Farmanguinhos/Fiocruz. Lote: 12080937. Validade: 08/2014.
- Comprimidos de fosfato de primaquina (15 mg de primaquina base) – fabricado por Farmanguinhos/Fiocruz. Lote: 12040391. Validade: 04/2014.

#### 1.1.2 Reagentes e Vidraria

- Reagentes grau analítico: acetato de amônio e ácido fórmico.
- Reagentes grau cromatográfico: acetonitrila, diclorometano, metanol, acetato de etila, hexano e metil-*t*-butil éter.
- Água destilada e deionizada em sistema Millipore.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Tubos de vidro de 10 cm.
- Béqueres, erlenmeyers e kit de filtração.

#### 1.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultra-som BRANSONIC 220.
  - Aparelho para infusão direta KD Scientific.
  - Balança analítica SARTORIUS BP210D com precisão de 0,01 mg.
-

- Centrífuga JOUAN MR 23 I.
- Coluna cromatográfica ACE<sup>®</sup> 5 C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 µm).
- Coluna cromatográfica Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência WATERS, composto por bomba binária 1525µ, auto injetor 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a espectrômetro de massas WATERS Quattro LC.
- Estufa marca FANEM Orion 515.
- Handy step Brand.
- Micropipetas P1000 e P200 Gilson.
- Pipetas calibradas marca BRAND.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus marca Millipore.
- Vórtex JK MS1.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma humano

Para o desenvolvimento de um método de quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma humano por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas, foram otimizados os parâmetros de detecção, as condições cromatográficas e o procedimento de extração das amostras. O método foi validado de acordo com as especificações da Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

#### 1.2.1.1 Detecção por espectrometria de massas

Para a detecção por espectrometria de massas da cloroquina e primaquina, procedeu-se com a avaliação e otimização da detecção por infusão direta da solução dos fármacos e do padrão interno. Foram avaliadas, isoladamente, soluções

---



de cloroquina, primaquina e de amodiaquina (padrão interno) a 500 ng/mL em metanol. A ionização foi por *electrospray* no modo positivo (ESI(+)).

Em ESI(+), os principais parâmetros otimizados para obtenção de íons precursores  $[M+H]^+$  de alta intensidade nos espectros de massa (*MS scan*) foram a voltagem do capilar (kV), voltagem do cone (V), as temperaturas da fonte e de desolvatação, e resolução LM-HM (*Low mass/High mass*). 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).

#### 1.2.1.2 Análise cromatográfica

Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas encontradas na literatura científica para quantificação em plasma de cloroquina, primaquina e de amodiaquina. Foram avaliados o uso de coluna cromatográfica C<sub>18</sub> e ciano, fase móvel constituída de acetonitrila ou metanol, como solvente orgânico; e solução de ácido fórmico e tampão de acetato de amônio em diferentes valores de pH como solvente aquoso. A proporção de cada solvente também foi avaliada. Os parâmetros foram otimizados de acordo com os melhores resultados em relação à intensidade do sinal dos fármacos no espectrômetro de massas, ao tempo de análise e à separação de interferentes da matriz.

#### 1.2.1.3 Extração dos fármacos no plasma

Foram avaliados os métodos de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido, para a otimização da extração de cloroquina e primaquina do plasma. Os dois métodos foram escolhidos por serem os mais usados na literatura científica para extração, isoladamente, de cloroquina e primaquina do plasma, e por serem de custo menor em relação à extração por fase sólida.

Para a realização dos testes, foram adicionados padrões de cloroquina e primaquina em plasma humano branco. As faixas de concentrações plasmáticas avaliadas foram definidas de acordo com dados obtidos na literatura científica (**Tabela 4**). Para

---

a cloroquina, a faixa avaliada foi de 1,0 ng/mL a 3000,0 ng/mL. Para a primaquina foi avaliada a faixa de 2,0 ng/mL a 1500,0 ng/mL. Essas faixas foram utilizadas como referência para determinação das concentrações dos analitos na curva de calibração.

Para a avaliação da extração por precipitação de proteínas, foi preparada uma solução dos analitos em metanol, de modo a obter uma solução padrão única contendo cloroquina, primaquina e amodiaquina a 600 ng/mL. Uma alíquota de 25 µL desta solução foi adicionada em 125 µL de plasma branco em tubos de 10 mL, de forma a obter cloroquina, primaquina e amodiaquina a 100 ng/mL no plasma. Agitou-se em vórtex por cinco segundos, e em seguida adicionou-se o solvente orgânico para precipitação das proteínas. Os solventes avaliados foram metanol e acetonitrila. Agitou-se, novamente, por mais 40 segundos e centrifugou-se por cinco minutos, a 14000 rpm e temperatura de 5 °C. O sobrenadante foi transferido para um *vial* e injetou-se 20 µL da solução obtida em cromatógrafo.

Para a avaliação da extração líquido-líquido, foi preparada uma solução padrão única contendo cloroquina, primaquina e amodiaquina a 600 ng/mL de acordo com o descrito para a avaliação da precipitação por proteínas. Uma alíquota de 50 µL desta solução foi adicionada em 250 µL de plasma branco em tubos de 10 mL, de forma a obter cloroquina, primaquina e amodiaquina a 100 ng/mL no plasma. Agitou-se em vórtex por cinco segundos, e em seguida adicionou-se 2 mL de solvente extrator. Os solventes extratores avaliados foram misturas de acetato de etila, diclorometano e metil-*t*-butil éter (MTBE) em diferentes proporções:

- MTBE (100%);
- Acetato de etila: Diclorometano: MTBE (4:3:3);
- Acetato de etila:MTBE (1:1).

Agitou-se, novamente, por mais 60 segundos e 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 móvel descrita no item 1.2.2.1, com agitação em vórtex por 40 segundos. Injetou-se 20 µL da solução obtida em cromatógrafo.

---

Em todos os procedimentos avaliados durante o desenvolvimento do método, foi realizada a extração de uma amostra de plasma humano branco, que não havia sido adicionado os fármacos nem os padrões internos, visando a avaliação de possíveis interferentes provenientes do meio plasmático que poderiam ser detectados no espectrômetro de massas nas condições cromatográficas escolhidas. Além disso, analisou-se também uma amostra de plasma humano, no qual foi adicionado apenas a solução dos padrões de cloroquina e primaquina na concentração de 100 ng/mL em fase móvel descrita no item 1.2.2.1 na etapa de reconstituição do resíduo da extração líquido-líquido.

## 1.2.2 Validação do método bioanalítico

### 1.2.2.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters<sup>®</sup> acoplado a espectrômetro de massas Waters<sup>®</sup> Quattro LC. Foi utilizada coluna cromatográfica Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi metanol e solução acetato de amônio 0,01 M com pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico na proporção de 30:70, no modo isocrático. O fluxo de fase móvel foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL.

### 1.2.2.2 Preparo das soluções padrão dos controle de qualidade, de limite superior e inferior de quantificação

Foram preparadas soluções de controle de qualidade, em três diferentes concentrações: baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA). As amostras de controle de qualidade são analisadas juntamente com as amostras da corrida analítica para verificar a conformidade do sistema e das condições empregadas. O CQA é a amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75% e 85% da maior concentração da curva de calibração; o CQB é a amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes ao LIQ; e o CQM é a amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre o LIQ e o LSQ.

---

Para obtenção dos controles de qualidade (CQA, CQM, CQB) e limites de quantificação (LIQ e LSQ) para contaminação do plasma, foram preparadas soluções únicas de padrão de cloroquina, primaquina e amodiaquina como descrito nos itens 1.2.2.2.1, 1.2.2.2.2 e 1.2.2.2.3, tendo sempre a fase móvel como diluente. Para a realização dos ensaios de validação, uma alíquota de 50 µL desta solução única foi adicionada em 250 µL de plasma branco em tubos de 10 mL, em seguida agitou-se vórtex por cinco segundos. Após o processo de extração, a concentração teórica dos fármacos reconstituídos está descrita na **Tabela 22**.

**Tabela 22 – Concentrações dos controles de qualidade e limites de quantificação da cloroquina, primaquina e amodiaquina.**

<i>Solução</i>	<i>Conc cloroquina (ng/mL)</i>	<i>Conc primaquina (ng/mL)</i>	<i>Conc amodiaquina (ng/mL)</i>
LSQ	3000	1500	400
CQA	2400	1200	400
CQM	1200	600	400
CQB	3	6	400
LIQ	1	2	400

Para o preparo das soluções dos controles de qualidade (CQA, CQM, CQB) e limites de quantificação (LIQ e LSQ) em fase móvel e que não seriam submetidas a processo de extração, as soluções únicas de padrão dos fármacos preparadas conforme os itens 1.2.2.2.1, 1.2.2.2.2 e 1.2.2.2.3, foram diluídas cinco vezes em fase móvel, para obter as concentrações representadas na **Tabela 22**.

#### 1.2.2.2.1 Preparo das soluções de cloroquina

Inicialmente pesou-se 6,26 mg de fosfato de cloroquina SQR para balão volumétrico de 25 mL e dilui-se com metanol, obtendo uma solução a 155,27 µg/mL de cloroquina base livre. A partir dessa solução prepararam-se as soluções únicas dos padrões dos controles de qualidade (CQ), de limite superior (LSQ) e inferior de quantificação (LIQ). Para o preparo em relação à cloroquina, as diluições foram realizadas conforme descrito na **Tabela 23**.

**Tabela 23 – Preparo das soluções padrão de cloroquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol.**

<i>Solução</i>	<i>Conc da solução mãe (µg/mL)</i>	<i>Volume a ser pipetado da solução mãe (µL)</i>	<i>Conc final (µg/mL)</i>	<i>Diluente q.s.p. (mL)</i>
Intermediária	155,27	64,0	1,000	10,0
LSQ	155,27	966,0	15,000	10,0
CQA	155,27	773,0	12,000	10,0
CQM	155,27	193,0	3,000	10,0
CQB	1,00	150,0	0,015	10,0
LIQ	1,00	50,0	0,005	10,0

## 1.2.2.2.2 Preparo das soluções de primaquina

Inicialmente pesou-se 6,98 mg de fosfato de primaquina SQR para balão volumétrico de 25 mL e dilui-se com metanol, obtendo uma solução a 159,03 µg/mL de primaquina base livre. A partir dessa solução prepararam-se as soluções únicas dos padrões dos controles de qualidade (CQ), de limite superior (LSQ) e inferior de quantificação (LIQ). Para o preparo em relação à primaquina, as diluições foram realizadas conforme descrito na **Tabela 24**.

**Tabela 24 – Preparo das soluções padrão de primaquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol.**

<i>Solução</i>	<i>Conc da solução mãe (µg/mL)</i>	<i>Volume a ser pipetado da solução mãe (µL)</i>	<i>Conc final (µg/mL)</i>	<i>Diluente q.s.p. (mL)</i>
Intermediária	159,03	126,0	2,000	10,0
LSQ	159,03	472,0	7,500	10,0
CQA	159,03	377,0	6,000	10,0
CQM	159,03	189,0	3,000	10,0
CQB	2,00	150,0	0,030	10,0
LIQ	2,00	50,0	0,010	10,0

## 1.2.2.2.3 Preparo das soluções de amodiaquina

Inicialmente pesou-se 5,01 mg de fosfato de amodiaquina SQR para balão volumétrico de 25 mL e dilui-se com metanol, obtendo uma solução a 152,86 µg/mL de amodiaquina base livre. A partir dessa solução prepararam-se as soluções únicas dos padrões dos controles de qualidade (CQ), de limite superior (LSQ) e inferior de quantificação (LIQ). Para o preparo em relação à amodiaquina, as diluições foram realizadas conforme descrito na **Tabela 25**.

**Tabela 25 – Preparo das soluções padrão de amodiaquina de controle de qualidade e limites de quantificação para contaminação do plasma. Diluente: metanol.**

<i>Solução</i>	<i>Conc da solução mãe (µg/mL)</i>	<i>Volume a ser pipetado da solução mãe (µL)</i>	<i>Conc final (µg/mL)</i>	<i>Diluente q.s.p. (mL)</i>
LSQ	152,9	131,0	2,000	10,0
CQA	152,9	131,0	2,000	10,0
CQM	152,9	131,0	2,000	10,0
CQB	152,9	131,0	2,000	10,0
LIQ	152,9	131,0	2,000	10,0

## 1.2.2.3 Seletividade

No caso de métodos bioanalíticos, os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. Foram analisadas seis amostras, sendo quatro amostras de plasma branco normal, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico, todas sem adição de analito e padrão interno. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ) na curva de calibração. A forma de preparo do LIQ está descrito no item 1.2.2.2. Foram também avaliadas uma amostra de plasma branco contaminado com possíveis medicamentos que possam ser utilizados pelos voluntários: cafeína, paracetamol e dipirona. Estes fármacos foram escolhidos por serem os mais comumente encontrados em medicamentos utilizados para

tratamento da cefaléia e sintomas da gripe, que são os medicamentos de uso comum. A concentração da solução de cafeína preparada foi de 5 µg/mL, a da solução de paracetamol foi de 100 µg/mL e a da solução de dipirona foi de 25 µg/mL, todas tendo metanol como diluente. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção dos analitos e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração do limite inferior de quantificação.

#### 1.2.2.4 Efeito matriz

O efeito matriz pode ser avaliado através de experimentos de recuperação onde amostras são contaminadas com quantidades conhecidas do analito. Para o experimento foram preparadas oito amostras branco extraídas, sendo quatro nas mesmas concentrações do CQB e quatro nas mesmas concentrações do CQA; duas lipêmicas, cada uma nas mesmas concentrações do CQB e do CQA; e duas hemolisadas, também com cada uma nas mesmas concentrações do CQB e do CQA. O modo de preparo das amostras de CQB e CQA está descrito no item 1.2.2.2. Os resultados obtidos foram comparados com amostras de plasma branco extraídas e reconstituídas com soluções dos fármacos em fase móvel, nas mesmas concentrações do CQA e CQB. A partir das respostas dos analitos e do padrão interno em matriz e em solução, calculou-se o fator de matriz normalizado (FMN):

$$FMN = \frac{\left( \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do Padrão Interno em matriz}} \right)}{\left( \frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do Padrão Interno em solução}} \right)}$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMN's relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

---

#### 1.2.2.5 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Foram preparadas cinco amostras de cada concentração (CQA, CQM e CQB) de acordo com o descrito no item 1.2.2.2 e processadas conforme método de extração definido. Além disso, preparou-se também uma solução única dos padrões dos fármacos em fase móvel para cada concentração (CQA, CQM e CQB).

Para determinar a porcentagem de recuperação do método, foi feita a comparação das áreas obtidas com amostras de plasma contendo os fármacos submetidas ao processo de extração e amostras dos fármacos em fase móvel, nas mesmas concentrações.

---



## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em plasma humano

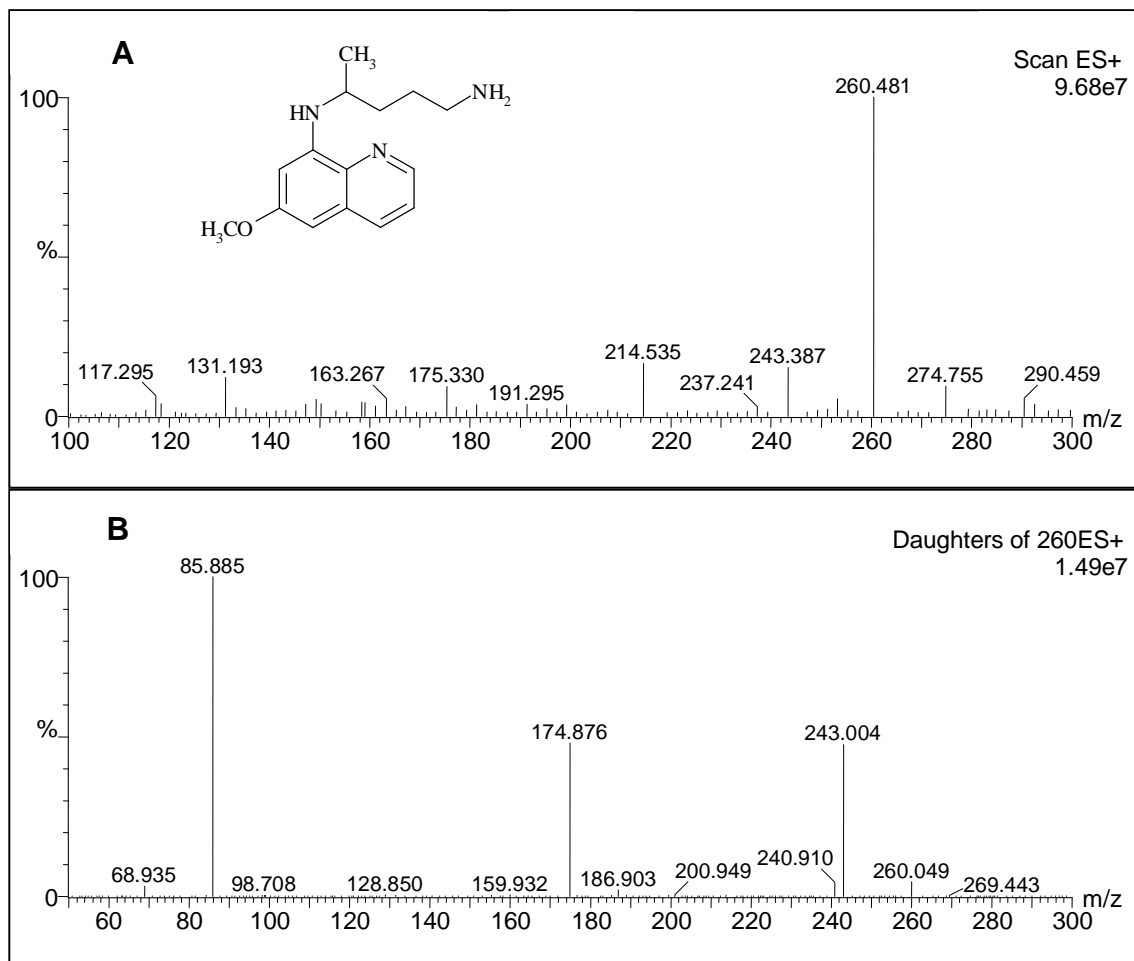
#### 2.1.1 Detecção por espectrometria de massas

Para a quantificação simultânea de dois ou mais fármacos no espectrômetro de massas, todos os parâmetros do detector devem ser os mesmos, com exceção das energias do cone e de colisão, que podem ser otimizadas individualmente para cada fármaco.

Para a otimização da ionização e detecção de primaquina por ESI(+), foi realizada infusão direta de uma solução a 500 ng/mL em metanol. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados de modo a obter um íon precursor de alta intensidade. Os melhores resultados foram obtidos com voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 22 eV, extrator de 2 V, lentes RF 0,5; temperatura da fonte de 100 °C e temperatura de desolvatação de 300 °C. Foi obtido o íon precursor  $[M+H]^+$  com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 260,48; que corresponde a massa molar da primaquina (259,35 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. No espectro de fragmentação obtido com uma energia de colisão de 15 eV (*Daughter Scan*), o fragmento de maior intensidade foi o íon com  $m/z$  174,88. Assim, a transição escolhida para detecção da primaquina foi de  $m/z$  260,48 para 174,88. Os espectros do íon precursor e de fragmentação estão representados na **Figura 16**.

---

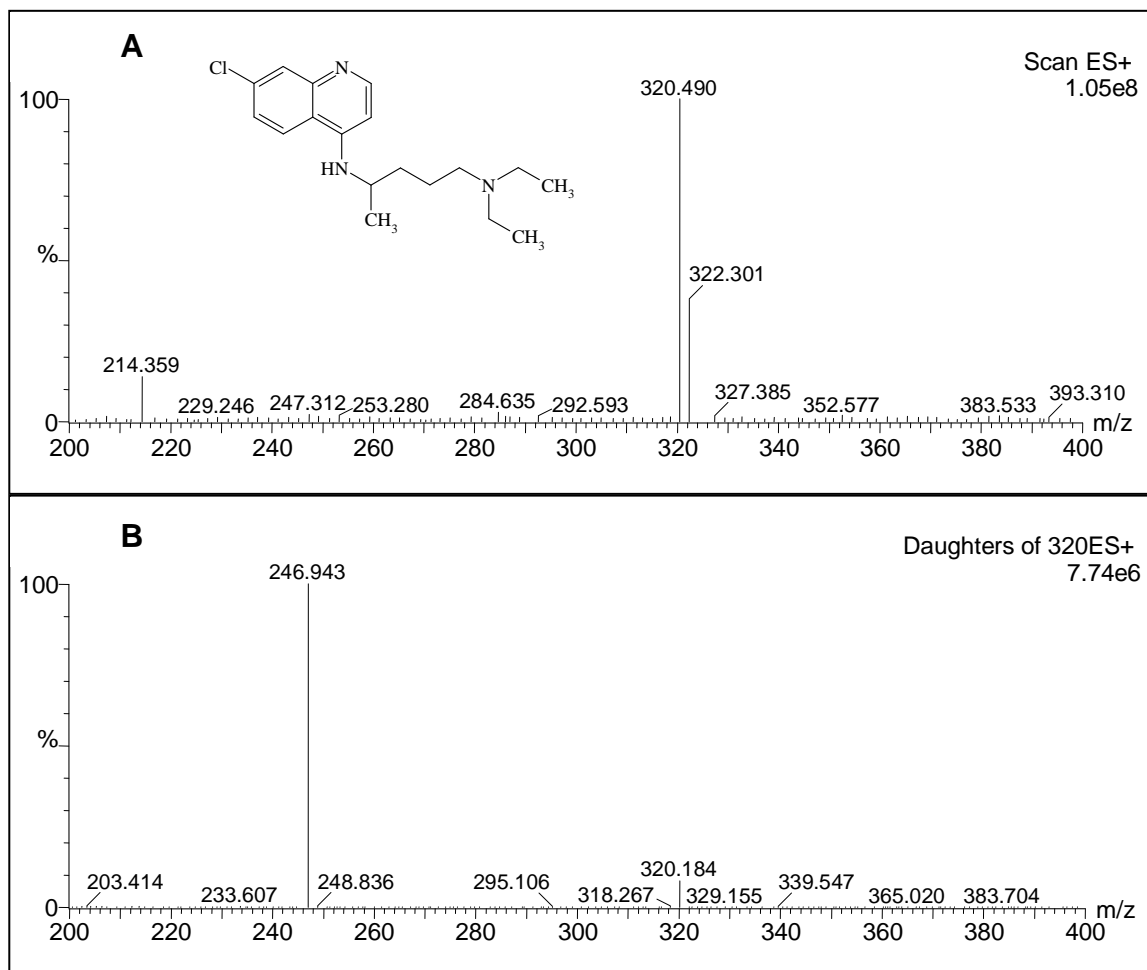
**Figura 16 – Espectros ESI(+)-MS da primaquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  260,48 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  174,88.**



Para a otimização da ionização e detecção de cloroquina por ESI(+), foi realizada infusão direta de uma solução a 500 ng/mL em metanol. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados de modo a obter um íon precursor de alta intensidade. Os melhores resultados foram obtidos com voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 25 eV, extrator de 2 V, lentes RF 0,5; temperatura da fonte de 100 °C e temperatura de desolvatação de 300 °C. Foi obtido o íon precursor  $[M+H]^+$  com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 320,49; 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 20 eV (*Daughter Scan*), o fragmento de maior intensidade foi o  $m/z$  246,94. Assim, a transição escolhida para detecção da

cloroquina foi de  $m/z$  320,49 para 246,94. Os espectros do íon precursor e de fragmentação estão representados na **Figura 17**.

**Figura 17** – Espectros ESI(+)-MS da cloroquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  320,49 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  246,94.

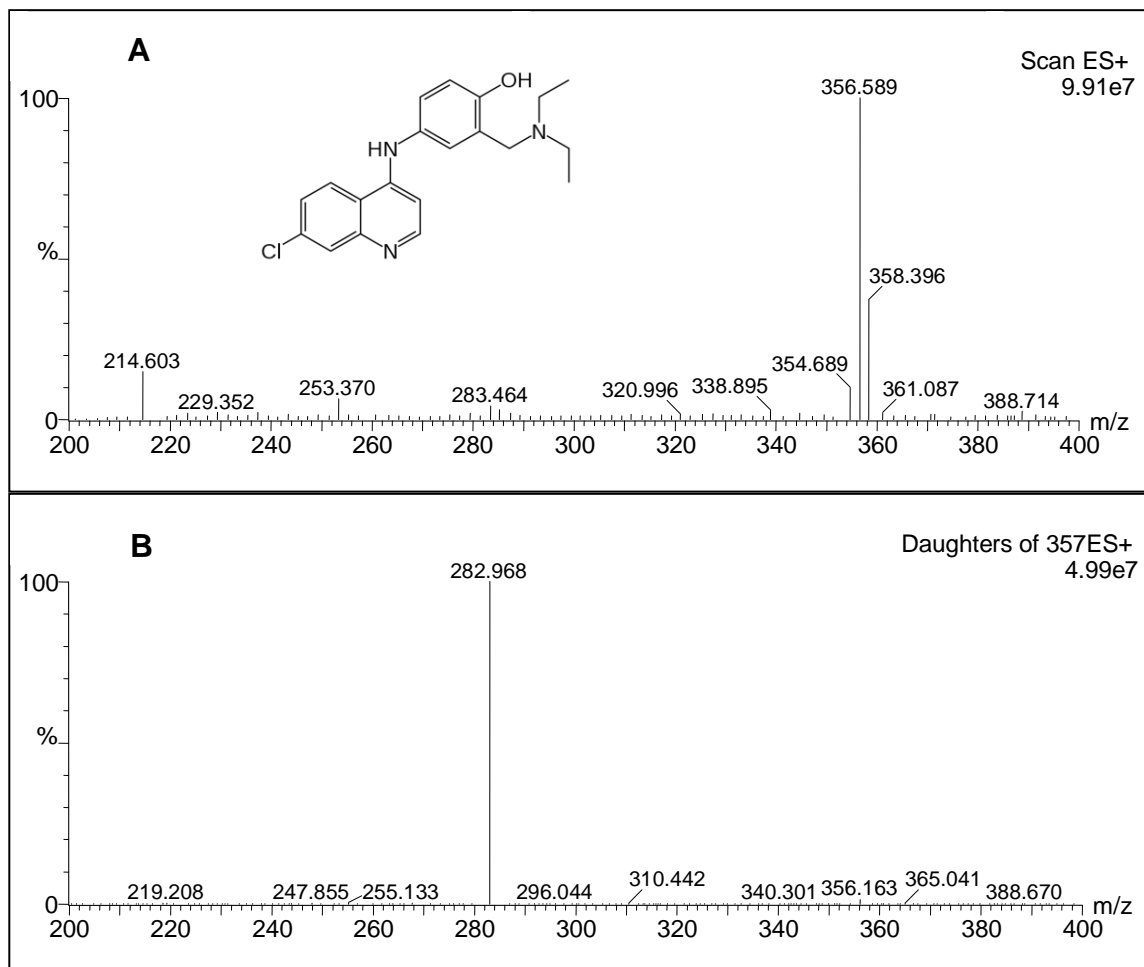


A cloroquina, por ser uma substância clorada apresenta padrão isotópico característico no espectro de massas, tendo em vista que o cloro apresenta os isótopos  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ , com abundância de cerca de 75% e 25%, respectivamente. No espectro de massas de moléculas com um átomo de cloro obtêm-se, além do pico do íon molecular, o pico  $M^{+2}$ , que correspondem às diferentes contribuições dos isótopos na molécula do analito (CÉSAR, 2009). Como o método desenvolvido visa a determinação quantitativa dos analitos em meio biológico, o pico de maior intensidade ( $m/z$  320,49) foi selecionado como íon precursor, de forma a aumentar a sensibilidade do método.

Para a otimização da ionização e detecção da amodiaquina (padrão interno) por ESI(+), também foi realizada infusão direta de uma solução a 500 ng/mL em metanol. Foram utilizados os parâmetros do espectrômetro de massas já previamente otimizados para detecção de primaquina e cloroquina. Apenas a voltagem do cone foi otimizada de modo a obter um íon precursor de alta intensidade. Os melhores resultados foram obtidos com voltagem do cone de 20 eV, na qual se obteve o íon precursor  $[M+H]^+$  com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 356,59; que corresponde a massa molar da amodiaquina (355,87 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. No espectro de fragmentação obtido com uma energia de colisão de 18 eV (*Daughter Scan*), o fragmento de maior intensidade foi o  $m/z$  282,97. Assim, a transição escolhida para detecção da amodiaquina foi de  $m/z$  356,59 para 282,97. Os espectros do íon precursor e de fragmentação estão representados na **Figura 18**. A amodiaquina também é uma substância clorada, por isso apresentou padrão isotópico característico no espectro de massas da mesma forma que a cloroquina.

---

**Figura 18 – Espectros ESI(+)-MS da amodiaquina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  356,59 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  282,97.**



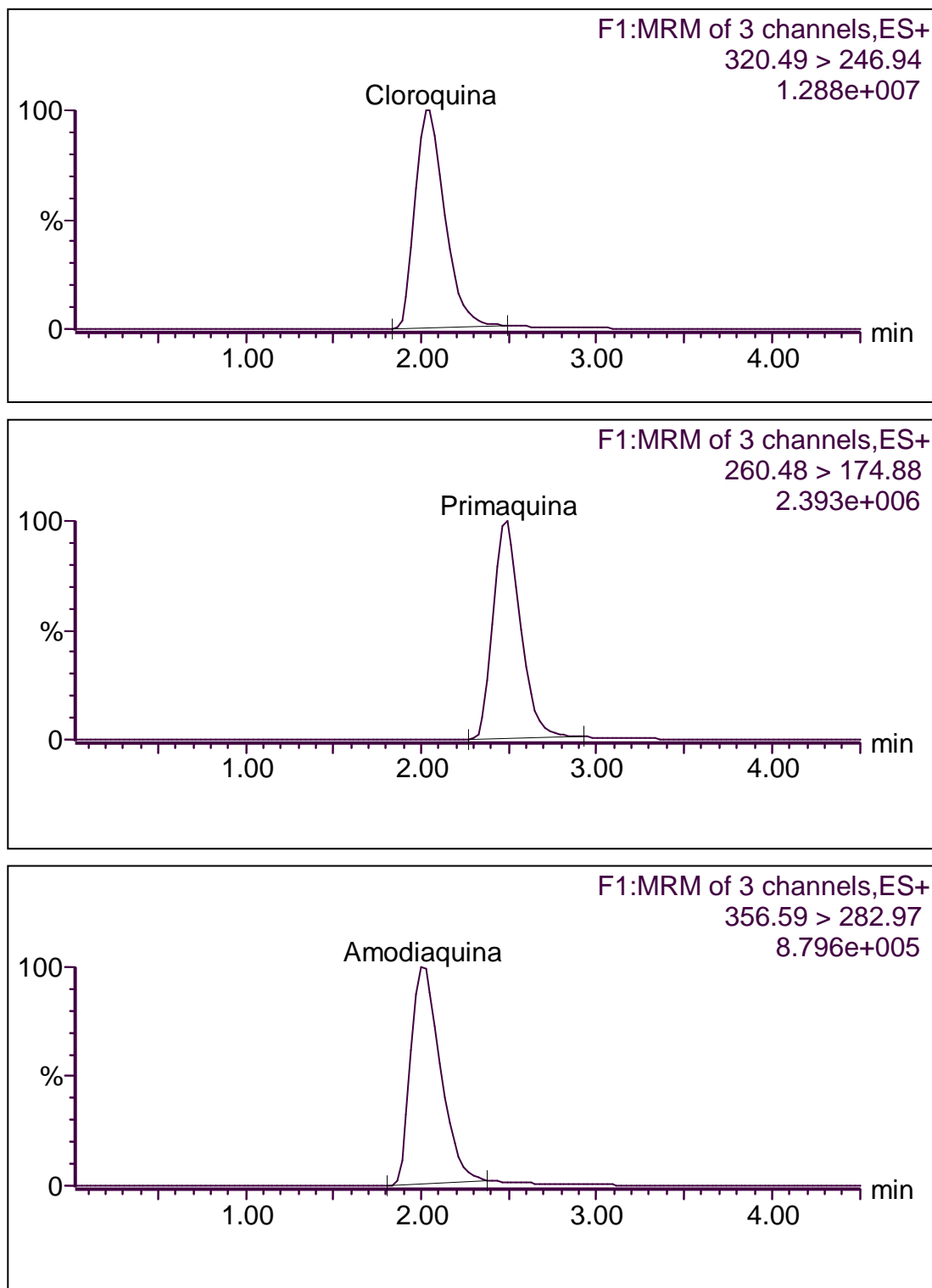
### 2.1.2 Análise cromatográfica e extração dos fármacos do plasma

Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas encontradas na literatura científica para quantificação em plasma de cloroquina ou primaquina ou amodiaquina. Trabalhou-se com coluna cromatográfica  $C_{18}$  e fase móvel constituída de metanol e solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) na proporção de 75:25. Alguns parâmetros foram alterados, como a composição e proporção dos componentes da fase móvel, visando otimizar a intensidade do sinal dos fármacos no espectrômetro de massas, o tempo de análise e a separação de interferentes da matriz. Nas condições iniciais descritas, a cloroquina e a amodiaquina apresentaram baixa retenção. Mesmo com as alterações na fase móvel, os resultados não foram satisfatórios, pois quando era alcançado o aumento da retenção da cloroquina e da amodiaquina, o tempo de corrida também aumentava bastante e causava o

alargamento do pico da primaquina. Decidiu-se trocar a coluna cromatográfica por uma Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), mantendo o metanol como solvente orgânico da fase móvel. O solvente aquoso selecionado foi um tampão acetato de amônio 0,01 M. Tendo em vista que a retenção e a simetria dos fármacos analisados sofrem influência significativa do pH da fase móvel, foi necessário avaliar diferentes valores de pH da solução tampão, visando obter picos simétricos e um tempo de corrida adequado. Inicialmente avaliou-se valores de pH próximos ao neutro, porém o tempo de corrida cromatográfica ficou superior a oito minutos, e mesmo aumentando a proporção do solvente orgânico, os resultados não foram satisfatórios. Com o tampão pH 4,5, o tempo de retenção dos analitos diminuiu, mas o tempo de corrida de seis minutos ainda foi considerado elevado. Avaliou-se o pH 2,5, que diminuiu bastante a retenção da cloroquina e da amodiaquina, e também avaliou-se o pH 3,0, que apresentou tempo de corrida total de quatro minutos, e uma simetria satisfatória dos picos. A fase móvel final foi constituída de 70% de metanol e 30% de tampão acetato de amônio 0,01 M com pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico. A condição cromatográfica final está descrita no item 1.2.2.1. Os cromatogramas dos picos da cloroquina, primaquina e amodiaquina em solução estão representados na **Figura 19**.

---

**Figura 19** – Cromatogramas obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de cloroquina e primaquina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por metanol e tampão acetato de amônio 0,01 M pH 3,0 (70:30). Concentração das soluções: cloroquina 1200 ng/mL, primaquina 600 ng/mL e amodiaquina 400 ng/mL.



Após o estabelecimento da condição cromatográfica ideal, vários procedimentos de preparação de amostra foram avaliados. Inicialmente, foi testado o método de extração por precipitação de proteínas utilizando metanol e acetonitrila como solventes orgânicos, conforme descrito no item 1.2.1.3. Apesar dos valores satisfatórios de recuperação dos fármacos com o uso de metanol (de 72% a 92%) e acetonitrila (de 55% a 83%), em ambos os casos, houve efeito matriz elevado para a extração da cloroquina, sendo descartada a extração por precipitação de proteínas.

Em seguida, passou-se a extração líquido-líquido, conforme descrito no item 1.2.1.3 deste capítulo, no qual foram avaliados vários solventes orgânicos extratores, em relação à taxa de recuperação dos fármacos e de efeito matriz. O uso de MTBE (100%) e da mistura de acetato de etila: MTBE: diclorometano (4:3:3) não eliminaram o efeito matriz, sendo descartados. O uso de MTBE (100%) também apresentou baixa recuperação para a primaquina (cerca de 15%).

Os efeitos de matriz são um dos maiores desafios no desenvolvimento de métodos bioanalíticos por LC-ESI-MS/MS. Estes efeitos são decorrentes de alterações na eficiência de ionização pela presença de substâncias que co-eluem com os analitos, provenientes da matriz biológica. O mecanismo exato do efeito de matriz ainda não é claro, entretanto, provavelmente se origina da competição entre o analito e componentes da matriz não detectados que co-eluem com o analito. Dependendo do ambiente no qual os processos de ionização e evaporação dos íons ocorrem, esta competição pode efetivamente diminuir (supressão de ionização) ou aumentar (indução de ionização) a eficiência da formação dos íons desejados do analito, presentes na fonte de ionização. Assim, a eficiência da formação de íons do analito é diretamente dependente da matriz que entra simultaneamente na fonte de ionização (MATUSZEWSKY, 2003).

O uso da mistura de acetato de etila:MTBE (1:1) como solvente orgânico no processo de extração líquido-líquido foi o que apresentou os melhores resultados em relação as taxas de recuperação (todas superiores a 85%) e valores de efeito matriz dentro de faixas recomendadas. Assim selecionou-se a extração líquido-líquido com

---



o uso da mistura de acetato de etila:MTBE (1:1) para a preparação das amostras de plasma.

### 2.1.3 Validação do método bioanalítico

#### 2.1.3.1 Seletividade

Os resultados obtidos demonstram que o método é seletivo em relação aos diferentes tipos de plasma analisados e aos medicamentos avaliados, uma vez que as áreas de todas as amostras obtidas foram inferiores a 20% da área obtida com o LIQ para a cloroquina e primaquina, e menores que 5% da área obtida com o padrão interno (amodiaquina). Além disso, acredita-se que os reduzidos valores de área obtidos nas transições de cloroquina e amodiaquina se devem principalmente ao efeito memória (*carry over*) do auto-injetor do que a interferentes da matriz biológica. Os resultados obtidos na avaliação da seletividade do método estão representados na **Tabela 26**.

**Tabela 26 – Resultados da avaliação da seletividade obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina).**

<i>Plasma</i>	<i>Cloroquina</i> (1 ng/mL)		<i>Primaquina</i> (2 ng/mL)		<i>Amodiaquina</i> (400 ng/mL)	
	<i>Tr</i>	<i>Área</i>	<i>Tr</i>	<i>Área</i>	<i>Tr</i>	<i>Área</i>
<b>Normal 1</b>	2,11	149	-	-	2,08	53
<b>Normal 2</b>	2,08	248	-	-	2,05	59
<b>Normal 3</b>	2,05	247	-	-	2,02	91
<b>Normal 4</b>	2,05	178	-	-	2,02	38
<b>Lípêmico</b>	2,05	174	-	-	2,02	51
<b>Hemolisado</b>	2,05	183	2,49	84	2,02	72
<b>Cafeína + Dipirona + Paracetamol</b>	2,05	261	-	-	2,00	52
<b>LIQ</b>	2,05	1496	2,49	980	2,05	183697
	2,05	1208	2,49	946	2,02	164557

### 2.1.3.2 Efeito matriz

Para avaliação do efeito matriz, as áreas obtidas com amostras de plasma branco reconstituídas com soluções dos fármacos em fase móvel foram comparadas com as áreas das mesmas soluções em fase móvel, injetadas diretamente no cromatógrafo. Duas concentrações de cloroquina e primaquina (CQB e CQA) e a concentração de trabalho do padrão interno (amodiaquina a 400 ng/mL) foram avaliadas. A partir das respostas dos analitos e do padrão interno em matriz e em solução, foi possível calcular o fator de matriz normalizado (FMN):

$$\text{FMN} = \frac{\left( \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do Padrão Interno em matriz}} \right)}{\left( \frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do Padrão Interno em solução}} \right)}$$

Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 27** e na **Tabela 28**.

---

**Tabela 27 – Resultados de efeito matriz obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina) na concentração do CQB.**

<b>CQB</b>								
<b>Plasma</b>	<b>AMO (400 ng/mL)</b>		<b>CLO (3 ng/mL)</b>		<b>FNM CLO</b>	<b>PRI (6 ng/mL)</b>		<b>FNM PRI</b>
	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>		<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	
<b>Normal 1</b>		789183		6412	0,99		2768	0,91
<b>Normal 2</b>		782501		5881	0,92		2656	0,88
<b>Normal 3</b>		822844		6929	1,03		3353	1,06
<b>Normal 4</b>		732876		5759	0,96		2729	0,96
<b>Lipêmico 1</b>	689352	855584	5658	7196	1,02	2661	3361	1,02
<b>Lipêmico 2</b>		783690		6010	0,93		3013	1,00
<b>Hemolisado 1</b>		766385		6088	0,97		2804	0,95
<b>Hemolisado 2</b>		837692		6186	0,90		2856	0,88
			<b>Média</b>		<b>0,96</b>	<b>Média</b>		<b>0,96</b>
			<b>CV (%)</b>		<b>4,89</b>	<b>CV (%)</b>		<b>6,72</b>

**Tabela 28 – Resultados de efeito matriz obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina) na concentração do CQA.**

CQA								
Plasma	AMO (400 ng/mL)		CLO (2400 ng/mL)		FNM CLO	PRI (1200 ng/mL)		FNM PRI
	Não extraída	Extraída	Não extraída	Extraída		Não extraída	Extraída	
Normal 1		623990		3259512	1,02		461354	1,15
Normal 2		597685		3218298	1,05		423733	1,10
Normal 3		609196		3287694	1,05		410071	1,05
Normal 4		645101		3395287	1,03		474295	1,14
Lipêmico 1	689352	586577	3526713	3145725	1,05	443329	383578	1,02
Lipêmico 2		631250		3315638	1,03		454813	1,12
Hemolisado 1		623082		3452302	1,08		464265	1,16
Hemolisado 2		631526		3428816	1,06		437094	1,08
					<b>Média</b>	<b>1,05</b>	<b>Média</b>	<b>1,10</b>
					<b>CV (%)</b>	<b>1,98</b>	<b>CV (%)</b>	<b>4,67</b>

Os resultados obtidos demonstram que não houve efeito de matriz significativo para nenhum dos fármacos e em nenhuma das concentrações analisadas, uma vez que todos os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 15%.

É importante que esta avaliação do efeito de matriz seja realizada com amostras de plasma provenientes de diferentes voluntários, uma vez que os compostos endógenos responsáveis pela supressão ou indução de ionização podem ser suscetíveis à variação interindividual. Desta forma, pode-se verificar efeitos de matriz distintos, em amostras plasmáticas provenientes de voluntários diferentes (CESAR, 2009).

## 2.1.3.3 Recuperação

A recuperação do padrão interno (amodiaquina) também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (400 ng/mL). Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 29**.

**Tabela 29** – Resultados de recuperação obtidos na extração da cloroquina, primaquina e do padrão interno (amodiaquina).

<b>Cloroquina</b>						
	<b>CQB (3 ng/mL)</b>		<b>CQM (1200 ng/mL)</b>		<b>CQA (2400 ng/mL)</b>	
	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>
<b>Média (área)</b>	7579	7956	2269176	2367484	4191330	4332900
<b>Recuperação (%)</b>	104,97		104,33		103,38	
<b>Recuperação média (%)</b>	104,23					
<b>Primaquina</b>						
	<b>CQB (6 ng/mL)</b>		<b>CQM (600 ng/mL)</b>		<b>CQA (1200 ng/mL)</b>	
	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>	<b>Não extraída</b>	<b>Extraída</b>
<b>Média (área)</b>	4079	4296	341243	373155	651275	658882
<b>Recuperação (%)</b>	105,33		109,35		101,17	
<b>Recuperação média (%)</b>	105,28					
<b>Amodiaquina</b>						
<b>400 ng/mL</b>		<b>Média (área)</b>		<b>Recuperação (%)</b>		
	<b>Não extraída</b>	168009		102,22		
	<b>Extraída</b>	171744				

Foram obtidas porcentagens de recuperação próximas a 100% para todos os fármacos, demonstrando que o procedimento de extração líquido-líquido empregado, apresenta elevada eficiência de extração. Este parâmetro pode contribuir de forma direta para a sensibilidade do método bioanalítico, pois quando o método de extração é capaz de recuperar quantidades elevadas do fármaco, conseqüentemente as áreas dos picos são maiores, propiciando a obtenção de limites de quantificação menores.

---

### 3 CONCLUSÃO

- A detecção de cloroquina e primaquina por espectrometria de massas, empregando fonte de ionização por *electrospray* e analisador triplo quadripolo, forneceu sinais de alta intensidade, permitindo o desenvolvimento de método de quantificação simultânea destes fármacos em plasma.
  
  - O método bioanalítico desenvolvido demonstrou ser simples, rápido, seletivo, além de fornecer taxas de recuperação próximas a 100%. De acordo com os dados já obtidos, acredita-se que o método tenha qualidade para atender a esses parâmetros de validação.
  
  - Este estudo contribuiu para a disponibilização de métodos rápidos, simples e viáveis para monitorização terapêutica de cloroquina e primaquina no tratamento clínico da malária.
-

**REFERÊNCIAS**

AGYEPONG, I. A.; ANSAH, E.; GYAPONG, M.; ADJEI, S.; BARNISH, G.; EVANS, D. Strategies to Improve Adherence to Recommended Chloroquine Treated Regimes: A Quasi-Experiment in the Context of Integrated Primary Health Care Delivery in Ghana. *Revista Social Science & Medicine*, v. 55, p. 2215-2226, 2002.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p.2224-2234, 2009.

AVULA, B.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; NANAYAKKARA, N.P.D.; MCCHESENEY, J.D.; WALKER, L.A.; KHAN, I.A. Analysis of primaquine and its metabolite carboxyprimaquine in biological samples: enantiomeric separation, method validation and quantification. *Biomedical Chromatography*, 2010.

BRAGA, E. M., FONTES, C. J. F. *Plasmodium*-malária. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 128-146

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 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de maio de 2012.

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

---



Referências

---

BRASIL, Ministério da Saúde. <portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/impressao/7721/162/casos-de-malaria-caem-<br>56-em-seis-anos.html> Acesso dia 22 de janeiro de 2013

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRONDZ, I.; MANTZILAS, D.; KLEIN, U.; EKEBERG, D.; HVATTUM, E.; LEBEDEVA, M.N.; MIKHAILITSYN, F.S.; SOULEIMANOV, G.D.; ROE, J. Nature of the main contaminant in the anti malaria drug primaquine diphosphate: a qualitative isomer analysis. *Journal of Chromatography B*, v. 800, p.211-223, 2004.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, v. 689, p. 175-180, 1997.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Estados Unidos da América. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>>. Acesso dia 21 de maio de 2011.

CÉSAR, I. C. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano. Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Fármacos e medicamentos. Belo Horizonte, 2009.

DEEN, J. L.; SEIDLEIN, L.; DONDORP, A. Therapy of uncomplicated malaria in children: a review of treatment principles, essential drugs and current recommendations. *Journal Tropical Medicine and International Health*, v.13, n.9, p.1111-1130, 2008.

---

Referências

---

DONGRE, V.G.; KARMUSE, P.; RAO, P. P.; KUMAR, A. Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, p. 236-242, 2008.

DUA, V.K.; KAR, SARIN, R.; SHARMA, V.P. High-performance liquid chromatographic determination of primaquine and carboxyprimaquine concentrations in plasma and blood cells in *Plasmodium vivax* malaria cases following chronic dosage with primaquine. *Journal of Chromatography B: biomedical applications*, v. 675, p.93-98, 1996.

DUA, V.K.; KAR, P.K.; GUPTA, N.C.; SHARMA, V.P. Determination of chloroquine and desethylchloroquine in plasma and blood cells of *Plasmodium vivax* malaria cases using liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p.199-205, 1999.

DWIVEDI, A.K.; SAXENA, D.; SINGH, S. HPLC and HPTLC assays for the antimalarial agents chloroquine, primaquine e bulaquine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 851-858, 2003.

EECKHAUT, A.V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p.2198-2207, 2009.

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

GUERIN, P. J., OLLIARO, P., NOSTEN, F., DRUILHE, P., LAXMINARAYAN, R., BINKA, F., KILAMA, W. L., FORD, N., WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet Infectious Diseases*, v.2, p.564-573, 2002.

---

Referências

---

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 430-440, 2008.

HODEL, E.M.; ZANOLARI, B.; MERCIER, T.; BIOLLAZ, J.; KEISER, J; OLLIARO, P.; GENTON, B.; DECOSTERD, L.A. A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 8877, p. 867-886, 2009.

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

JAMES, C.A.; BREDI, M.; FRIGERIO, E. Bioanalytical method validation: a risk-based approach?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, p.887-893, 2004.

KIM, Y.; KUH, H.; KIM, M.; KIM, Y.; CHUNG, W.; KIM, S.; KANG, M. Pharmacokinetics of primaquine and carboxyprimaquine in Korean patients with vivax malaria. *Archives of Pharmacological Research*, v. 27, nº 5, p. 576-580, 2004.

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.

MAITLAND, K.; WILLIAMS, T.N.; KOTECKA, B.M.; EDSTEIN, M.D.; RIECKMANN, K.H. Plasma chloroquine concentrations in Young and older malaria patients treated with chloroquine. *Acta Tropica*, v. 66, p.155-161, 1997.

MANUAL de Terapêutica da Malária. Colaboração de Agostinho Cruz Marques *et.al*. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, 2001.

---

Referências

---

MAYATRA, S.J.; PRASAD, B.; JAIN, M.; JAIN, R.; SINGH, S. Development and validation of a sensitive and selective UHPLC-MS/MS method for quantification of an investigation anti-malarial compound, 2-tert-butylprimaquine (NP-96) in rat plasma, and its application in a preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, p.410-415, 2010.

NAIR, A. DRESSMAN, J.B. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: primaquine phosphate. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 101, nº 3, 2012.

NITIN, M.; RAJANIKANTH, M.; MADHUSUDANAN, K.P.; GUPTA, R.C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay with a novel method of quantitation for the simultaneous determination of bulaquine and its metabolite, primaquine, in monkey plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 793, p.253-263, 2003.

NOGUEIRA, F. H. A.; GOULART, L. P. L.; CÉSAR, I. C.; CAMPOS, L. M. M.; PIANETTI, G.A. Development and validation of an HPLC method for mefloquine hydrochloride determination in tablet dosage form. *Journal of AOAC Internacional*, v. 94, nº 4, 2011.

OGA, S. *Fundamentos da Toxicologia*. Editora Atheneu, São Paulo, p.173-177, 1996.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química nova*, São Paulo, v. 24, nº 1, p.68-76, 2001.

SAAR, E.; GEROSTAMOULOS, D.; DRUMMER, O.H.; BEYER, J. Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood. *Analytical Bioanal. Chem.*, v. 393, p.727-734, 2009.

---

Referências

---

SAMANIDOU, V.F.; EVAGGELOPOULOU, E.N.; PAPADOYANNIS, I.N. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p.21-28, 2005.

SHAH, V. The history of bioanalytical method validation and regulation: evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. *The AAPS Journal*, vol 9 (1), article 5, 2007.

SINGHAL, P.; GAUR, A.; BEHL, V.; GAUTAM, A.; VARSHNEY, B.; PALIWAL, J.; BATRA, V. Sensitive and rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the quantification of chloroquine in dog plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 852, p. 293-299, 2007.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2<sup>o</sup> ed, New York: John Wiley Interscience, p.765, 1997.

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

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

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 32. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 34. 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da Malária um Século de Desenvolvimento de antimaláricos. *Revista Química*, v. 99, p.57-69, 2005.

---

Referências

---

VALE, N.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V.E.; GOMES, P.; MOREIRA, R. Primaquine dipeptide derivatives bearing na imidazolidin-4-one moiety at the Nterminus as potential anyimalarial prodrugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.44, p. 2506-2516, 2009.

VERBEECK, R.K., BARENDS, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data: chloroquine phosphate, chloroquine sulfate, and chloroquine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, nº 7, 2005.

WAHAJUDDIN, RAJU, K.S.R., TANEJA, I. Bioanalysis of antimalarials using liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 42, 2013.

WHOa, World Health Organization. *10 Facts on Malaria*. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>>. Acesso em 20 de maio de 2011.

WHOb, World Health Organization. *World Malaria Report 2010*. WHO Global Malaria Programme, Geneva, 2010. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalariareport2010.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf)>. Acesso em 10 de maio de 2011.

WHOc, 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](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf)>. Acesso em 10 de maio de 2011.

WHOd, World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 2ª ed., WHO, Geneva, 2010. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf)>. Acesso em 10 de maio de 2011.

---

Referências

---

WHOe, World Health Organization. *World Malaria Report 2012*. WHO Global Malaria Programme, Geneva, 2012. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_country\\_profiles.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_country_profiles.pdf)>. Acesso em 22 de janeiro de 2013.

WHOf, World Health Organization. <[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_Malaria\\_2010.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2010.png)> Acesso em 28 de janeiro de 2013.

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

YESHIWONDIM, A.K.; TEKLE, A.H.; DENGELA, D.O.; YOHANNES, A.M.; TEKLEHAIMANOT, A. Therapeutic efficacy of chloroquine and chloroquine plus primaquine for the treatment of *Plasmodium vivax* in Ethiopia. *Acta Tropica*, v. 113, p.105-113, 2010.

YONEMITSU, K.; KOREEDA, A.; KIBAYASHI, K.; NG'WALALI, P.; MBONDE, M.; KITINYA, J.; TSUNENARI, S. HPLC analysis of anti-malaria agent, chloroquine in blood and tissue from forensic autopsy cases in Tanzania. *Legal medicine*, v. 7, p.113-116, 2005.

---