

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Diego Medeiros Dias da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO FÁRMACOS  
ANTIMALÁRICOS ADSORVIDOS EM PAPEL FILTRO POR CLAE-EM/EM**

Rio de Janeiro

2017

Diego Medeiros Dias da Silva

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO FÁRMACOS  
ANTIMALÁRICOS ADSORVIDOS EM PAPEL FILTRO POR CLAE-EM/EM

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fábio Coelho Amendoeira  
Dra. Laís Bastos da Fonseca

Rio de Janeiro  
2017

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Silva, Diego Medeiros Dias da

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para quantificação simultânea de quatro fármacos antimaláricos adsorvidos em papel filtro por clae-em/em. / Diego Medeiros Dias da Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

167 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira.  
Co-orientadora: Laís Bastos da Fonseca.

1. Espectrometria de Massas. 2. Malária. 3. Fármacos Antimaláricos. I. Título.

Development and validation of a bioanalytical method for simultaneous quantification of four antimalarial drugs adsorbed on filter paper by HPLC-MS/MS.

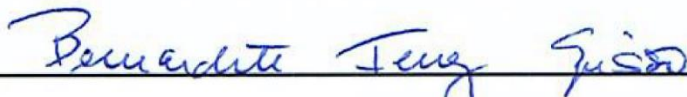
Diego Medeiros Dias da Silva

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO FÁRMACOS  
ANTIMALÁRICOS ADSORVIDOS EM PAPEL FILTRO POR CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 23 / 10 / 12

BANCA EXAMINADORA



Bernardete Ferraz Spisso (Doutora).

Departamento de Química, INCQS, Fundação Oswaldo Cruz.



Carlos Eduardo Rodrigues de Paula (Doutor).

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.



Heliana Martins Pereira (Doutora).

SEFAR, VPPIS, Fundação Oswaldo Cruz.



Fábio Coelho Amendoeira (Doutor) - Orientador.

Laboratório de Farmacologia, INCQS, Fundação Oswaldo Cruz.



Laís Bastos da Fonseca (Doutora) - Orientadora.

SEFAR, VPPIS, Fundação Oswaldo Cruz.



Para os meus pais Edmar e Rosana, que tudo fizeram (e ainda fazem) em busca de me dar sempre o melhor e para os meus irmãos Érica e Daniel, meus primeiros e melhores amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado algumas qualidades e muitos defeitos, o que me fez conhecer pessoas incríveis durante a vida.

Para meus pais e irmãos, a base de tudo, por serem meus maiores exemplos.

Para os meus avós, Sr. Floro e Sra. Dora por terem sido mais que avós e conseguido transmitir valores que podem ser levados durante toda a vida; e Sra. Nancy, por estar sempre ao meu lado.

A toda a minha família, meus padrinhos, tios e primos que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

A Prof. Dra. Marlice, que foi a primeira a acreditar no meu potencial e me incentivar a sempre ir em frente.

Ao Douglas por transmitir mais que conhecimento técnico-científico, por estar sempre presente em todos os momentos, sendo o irmão mais velho que nunca tive.

A Heliana, por toda sinceridade e companheirismo, uma amiga muito rara de se encontrar nos dias de hoje.

A duas amigas muito especiais, Elen e Layza pela amizade, cumplicidade e por sua infinita paciência ao tentarem nunca me deixar derrotar pelas dificuldades da vida.

Para a Tatiane, pela sincera amizade, cumplicidade, companheirismo e presença em todos os momentos, mesmo nas horas em que eu menos mereci.

Ao corpo docente do INCQS sempre empenhado em transmitir conhecimento.

A todo o corpo técnico do SEFAR, em especial a Letícia por todo o companheirismo e paciência em superar mais esse desafio, para a Estephane, que nunca desistiu de encarar as piores adversidades junto comigo e para o João Felipe, eterno parceiro de todas as horas. Sem vocês nada disso teria sido possível...

Aos integrantes do LABFAR pelos momentos juntos.

Aos meus orientadores Fábio e Laís, pela oportunidade, disponibilidade e por sempre terem acreditado que tudo daria certo no final.

Ao Fausto por ser sempre solícito a ajudar no que for preciso.

A todas as pessoas que torcem por mim e se importam em me ver bem e feliz.

E a todas as pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma estiveram próximas a mim e participaram desse momento.

Mesmo que a vida pareça difícil, há sempre algo que você pode fazer para ter sucesso nela.

Stephen Hawking

## RESUMO

A malária é uma doença negligenciada de grande impacto na saúde pública que acomete regiões de baixa renda e difícil acesso. Seguindo a atual estratégia do governo brasileiro para o combate a essa enfermidade, onde reduzir o número de doentes é fundamental para evitar a circulação do protozoário responsável pela doença, é necessário a criação de ferramentas capazes de avaliar não só a adesão ao tratamento como também a sua eficácia. Com base nos atuais esquemas de tratamento orientados pelo Programa Nacional de Controle da Malária e medicamentos disponibilizados pelo SUS foi desenvolvido e validado, a partir de parâmetros determinados pela RDC N° 27 da ANVISA, um método bioanalítico para a extração e quantificação simultânea de cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina, em matriz biológica sangue total, adsorvida em papel filtro. A detecção foi efetuada por CLAE-EM/EM, de maneira remota, em amostras biológicas de pacientes residentes em áreas endêmicas da malária na região Norte do Brasil, em tratamento contra a doença seguindo o protocolo estabelecido pelo Governo Federal. Uma vez o método totalmente desenvolvido e validado, as amostras biológicas originadas dos pacientes foram analisadas por um método de extração simples, rápido, sensível e seletivo, através da técnica de extração líquido-líquido. Todos os parâmetros presentes na legislação em vigor foram alcançados com êxito para os quatro fármacos analitos nos ensaios de validação e nas amostras originadas de pacientes do estudo. Foi possível avaliar parâmetros como absorção e eliminação dos fármacos, o que permitiu verificar a adesão ao tratamento oferecido pelo Governo Federal, através do Sistema Único de Saúde.

Palavras-chave: Malária. Sangue total. Cloroquina. Mefloquina. Primaquina. Lumefantrina. CLAE-EM/EM. SUS. ANVISA. Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

Malaria is a neglected disease that has a major impact on public health, specially affecting low income regions. Following the current Brazilian Government's strategy to combat this disease, where reducing the number of patients is essential to avoid the circulation of the malarian parasite, it is necessary to create capable tools of evaluating not only the adherence to treatment but also its effectiveness. Based on the current treatment plans guided by the Programa Nacional de Controle da Malária and their medicines available by SUS, a dried blood spot filter paper bioanalytical methodology using HPLC-MS/MS for the simultaneous extraction and quantification of chloroquine, mefloquine, primaquine and lumefantrine was developed and validated, according to RDC N°. 27 of ANVISA in biological samples of patients residing in malaria endemic areas in the northern region of Brazil, in treatment against the disease following the established protocol by the Federal Government. Once the method was fully developed and validated, the biological samples originated from the patients were analyzed by a simple, fast, sensitive and selective extraction method, using a liquid-liquid extraction technique. All the parameters present in the current legislation were successfully achieved for all the four analyte drugs of the study in the validation tests and in the samples originated from patients of the study, it was possible to evaluate parameters such as absorption and elimination of the drugs, which allowed to verify the adhesion of the treatment offered by the Federal Government, through the Sistema Único de Saúde.

Keywords: Malaria. Dried Blood Spot. Chloroquine. Mefloquine. Primaquine. Lumefantrine. HPLC-MS/MS. SUS. ANVISA. Health Surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa da distribuição da malária no mundo.....	27
Figura 2	Tratamento das infecções por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto).....	29
Figura 3	Tratamento das infecções por <i>P. vivax</i> , ou <i>P. ovale</i> com cloroquina em 3 dias e primaquina em 14 dias (esquema longo).....	29
Figura 4	Tratamento das infecções por <i>P. malariae</i> para todas as idades e das infecções por <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i> em gestantes e crianças com menos de 6 meses, com cloroquina em 3 dias.....	30
Figura 5	Tratamento das infecções por <i>P. falciparum</i> com a combinação fixa de artemeter + lumefantrina em 3 dias.....	30
Figura 6	Tratamento das infecções por <i>P. falciparum</i> com a combinação fixa de artemeter + lumefantrina em 3 dias.....	31
Figura 7	Alteração na taxa de mortalidade por malária no mundo.....	32
Figura 8	Mapa de áreas de risco para a transmissão da malária no Brasil.....	37
Figura 9	Área atual considerada endêmica da malária no Brasil.....	38
Figura 10	Número de casos de malária na região norte do Brasil.....	38
Figura 11	Ciclo de vida do parasito da malária.....	39
Figura 12	Fórmula estrutural da cloroquina.....	40
Figura 13	Fórmula estrutural da mefloquina.....	42
Figura 14	Fórmula estrutural da primaquina.....	43
Figura 15	Fórmula estrutural da lumefantrina.....	45
Figura 16	Diagrama ilustrativo dos principais componentes de um cromatógrafo líquido moderno.....	50
Figura 17	Modelo de ionização através de <i>electrospray</i> .....	52
Figura 18	Esquema representando dois espectrômetros de massas acoplados em modo sequencial, separados por uma câmara de colisão.....	53
Figura 19	Diagrama da dissociação induzida por colisão.....	54
Figura 20	Espectros representativos dos íons precursores e espectros dos íons produtos da cloroquina ( $m/z$ ) (320.0>247.0) (A e B), mefloquina ( $m/z$ ) (379.0>321.0) (C e D), primaquina ( $m/z$ ) (260.0>85.9) (E e F), lumefantrina ( $m/z$ ) (530.2>512.1) (G e H) e carbamazepina ( $m/z$ ) (237,0>194,1) (I e J), respectivamente.....	94

Figura 21	Curvas de calibração representativas referentes ao primeiro teste de TQI utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	101
Figura 22	Curvas de calibração representativas referentes ao segundo teste de TQI utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	103
Figura 23	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade sob condições de análise, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	106
Figura 24	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade de pós processamento, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	107
Figura 25	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	109
Figura 26	Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de seletividade.....	117
Figura 27	Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes.....	120
Figura 28	Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de efeito residual.....	125
Figura 29	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 01), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	128

Figura 30	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 02), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).....	129
Figura 31	Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 03), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D) .....	130
Figura 32	Média das concentrações plasmáticas de indivíduos em tratamento contra a malária com cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D) .....	134



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos principais fármacos antimaláricos .....	26
Tabela 2	Parâmetros farmacocinéticos da cloroquina .....	41
Tabela 3	Parâmetros farmacocinéticos da mefloquina .....	42
Tabela 4	Parâmetros farmacocinéticos da primaquina .....	44
Tabela 5	Parâmetros farmacocinéticos da lumefantrina .....	46
Tabela 6	Preparo das soluções de trabalho de uso diário da cloroquina .....	63
Tabela 7	Preparo das soluções de trabalho de uso diário da primaquina .....	65
Tabela 8	Preparo das soluções de trabalho de uso diário da mefloquina .....	66
Tabela 9	Preparo das soluções de trabalho de uso diário da lumefantrina .....	68
Tabela 10	Concentração das soluções de trabalho de uso diário dos analitos do estudo .....	68
Tabela 11	Equipamento analítico utilizado para a quantificação dos antimaláricos .....	72
Tabela 12	Resultados otimizados dos parâmetros dependentes do analito no espectrômetro de massas .....	92
Tabela 13	Resultados otimizados dos parâmetros dependentes da fonte no espectrômetro de massas .....	92
Tabela 14	Condições cromatográficas definidas para a aquisição das substâncias .....	95
Tabela 15	Níveis de concentração para a curva de calibração em cada um dos quatro analitos monitorados .....	96
Tabela 16	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TQI utilizado para o TEBLD e TEBPP .....	101
Tabela 17	Resultados obtidos na corrida analítica de TQI, utilizada para o TEBLD e TEBPP .....	102
Tabela 18	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TQI utilizado para o TEBCA e TEBCD .....	104
Tabela 19	Resultados obtidos na corrida analítica de TQI utilizada para o TEBCA e TEBCD .....	104

Tabela 20	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBCA .....	106
Tabela 21	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBPP .....	108
Tabela 22	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBCD .....	110
Tabela 23	Resultados do teste de estabilidade dos analitos do estudo em matriz biológica .....	111
Tabela 24	Resultados do teste de estabilidade dos analitos do estudo e do padrão interno em solução .....	116
Tabela 25	Resultados do teste de fator matriz normalizado pelo padrão interno, na ausência e presença de fármacos concomitantes/interferentes para as substâncias do estudo.....	123
Tabela 26	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE 01 .....	128
Tabela 27	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE 02 .....	130
Tabela 28	Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE 03 .....	131
Tabela 29	Resultados do teste de precisão e exatidão intradia e interdia realizado para os quatro analitos monitorados pelo método bioanalítico desenvolvido .....	132

## LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACS	<i>American Chemistry Society</i>
ACT	Terapia Combinada de Artemisinina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
BSN	Branco de sangue total normal
BSZ	Branco de sangue total normal adicionado de padrão interno
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CBZ	Carbamazepina
CE	<i>Collision Energy</i>
CEM	Comitê de Erradicação da Malária
CEM	<i>Channel Electron Multiplier</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEV	Campanha de Erradicação da Varíola
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
CLAE/UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detecção de Ultravioleta
CMAX	Concentração Máxima
CN	Ciano
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQC	Controle de Qualidade de Concentração Intermediária
CQD	Controle de Qualidade de Concentração Diluída
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
CRM	<i>Charged Residue Model</i>
CRQ	Cloroquina
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CV	Coeficiente de Variação
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
CYP2C19	Citocromo P450 2C19

CYP2C8	Citocromo P450 2C8
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DIC	Dissociação Induzida por Colisão
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
<i>DP</i>	<i>Declustering Potential</i>
EM = MS	Espectrômetro de Massas
EM/EM = EM <sup>2</sup>	Espectrômetro de Massas Acoplados em Sequência
<i>EP</i>	<i>Entrance Potential</i>
<i>ESI</i>	<i>Electrospray Ionization</i>
<i>ESI+</i>	<i>Positive Electrospray Ionization</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
<i>GE</i>	<i>General Electric</i>
<i>GS1</i>	<i>Ion Source Gas 1</i>
<i>GS2</i>	<i>Ion Source Gas 2</i>
H <sub>2</sub> O	Água
<i>IDM</i>	<i>Íon-Desorption Model</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<i>IS</i>	<i>Ionspray Voltage</i>
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LMF	Lumefantrina
LSQ	Limite Superior de Quantificação
<i>MALDI</i>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MeOH	Metanol
<i>MFI</i>	<i>Malaria Foundation International</i>
MFQ	Mefloquina
MS	Ministério da Saúde
MTBE = TBME	Metil terc Butil Éter
<i>m/z</i>	Relação massa/carga de íons e/ou fragmentos de íons
NT	Nota Técnica
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PA	Para Análise

PEC	Proposta de Emenda Constitucional
PMQ	Primaquina
PI = IS	Padrão Interno
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
STB	Solução de Trabalho
SUCAM	Superintendências de Campanhas de Saúde Pública
SUS	Sistema Único de Saúde
TEBCA	Teste de Estabilidade sob Condições de Análise
TEBCD	Teste de Estabilidade sob Ciclos de Congelamento e descongelamento
TEBLD	Teste de Estabilidade de Longa Duração
TEBPP	Teste de Estabilidade de Pós Processamento
TEBSCA	Teste de Estabilidade de Soluções sob Condições de Análise
TEBSTA	Teste de Estabilidade de Soluções sob Temperatura de Armazenamento
TEM	Teste de Efeito de Matriz
<i>TEM</i>	<i>Source Temperature</i>
TEMFC	Teste de Efeito de Matriz Contendo Fármacos
TER	Teste de Efeito Residual
<i>TOF</i>	<i>Time of Flight</i>
TPE	Teste de Precisão e Exatidão
TQI	Teste de Quantificação Inicial
TSE	Teste de Seletividade
TSEFC	Teste de Seletividade Contendo Fármacos Concomitantes/Interferentes
<i>USP</i>	<i>United States Pharmacopeia</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
AUC <sub>0-infinito</sub>	Área sobre a curva de zero a infinito
C18	Fase estacionária de octadecilsilano
C4	Fase estacionária de mutilsilano
C8	Fase estacionária de octasilano
Cl/f	A depuração corporal total de um fármaco
cps	Contagens por segundo
Da	Daltons
pH	Potencial de hidrogênios
q.s.	Quantidade suficiente
Q1	Quadrupolo 1
Q2	Quadrupolo 2
Q3	Quadrupolo 3
RP18	Coluna estacionaria de fase reversa de octadecilsilano
RP8	Coluna estacionaria de fase reversa de octasilano
sp.	Espécie
T <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida
T <sub>máx</sub>	Tempo máximo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>Ciclo biológico da malária</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2</b>	<b>Ação dos agentes antimaláricos</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3</b>	<b>A malária no mundo</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4</b>	<b>A malária no Brasil</b> .....	<b>33</b>
<b>1.5</b>	<b>Principais antimaláricos utilizados no Brasil</b> .....	<b>39</b>
1.5.1	Cloroquina .....	40
1.5.2	Mefloquina .....	41
1.5.3	Primaquina .....	43
1.5.4	Lumefantrina .....	44
<b>1.6</b>	<b>Identificação e diagnóstico da malária no Brasil</b> .....	<b>46</b>
<b>1.7</b>	<b>Métodos mais utilizados na análise de substâncias em matriz biológica</b> .....	<b>49</b>
1.7.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	49
1.7.2	Espectrometria de massas (EM) .....	51
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenvolvimento do método bioanalítico</b> .....	<b>56</b>
3.1.1	Padronização do papel filtro e coleta das amostras .....	56
3.1.2	Preparo das soluções de uso geral .....	56
3.1.2.1	<i>Preparo de solução de acetato de amônio 2 mol/L</i> .....	56
3.1.2.2	<i>Preparo de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L</i> .....	57
3.1.2.3	<i>Preparo da fase móvel aquosa - Solução aquosa contendo acetato de amônio 40 mmol/L e ácido fórmico q.s. para ajuste de pH a 3,50</i> .....	57
3.1.2.4	<i>Preparo da fase móvel orgânica - Metanol/acetonitrila (80:20, v/v)</i> .....	58
3.1.2.5	<i>Preparo da solução de lavagem do sistema de cromatografia - Metanol ....</i>	58
3.1.2.6	<i>Preparo da solução de diluição das soluções estoque dos analitos cloroquina, mefloquina e primaquina, do padrão interno carbamazepina, das substâncias interferentes nicotina e cafeína, de diluição das amostras e das soluções de trabalho de uso diário dos analitos e substâncias do estudo - Metanol/água ultrapurificada (80:20, v/v)</i> .....	58

3.1.2.7	<i>Preparo da solução de diluição da solução estoque do analito lumefantrina - Metanol/água ultrapurificada (80:20, v/v) + ácido fórmico 0,1%</i> .....	59
3.1.2.8	<i>Preparo da solução de extração - Éter metil terc-butílico</i> .....	59
3.1.2.9	<i>Preparo da solução de diluição da amostra - Metanol/acetonitrila (80:20, v/v)/solução aquosa contendo acetato de amônio 40 mmol/L e ácido fórmico q.s. para ajuste de pH a 3,50 (v/v) - (75:25, v/v)</i> .....	59
3.1.3	Preparo das soluções estoque dos analitos cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina .....	60
3.1.3.1	<i>Solução padrão estoque de cloroquina 1 mg/mL</i> .....	60
3.1.3.2	<i>Solução padrão estoque de primaquina 1 mg/mL</i> .....	61
3.1.3.3	<i>Solução padrão estoque de mefloquina 1 mg/mL</i> .....	61
3.1.3.4	<i>Solução padrão estoque de lumefantrina 1 mg/mL</i> .....	61
3.1.4	Preparo das soluções de trabalho de uso diário dos analitos cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina .....	62
3.1.4.1	<i>Preparo das soluções de trabalho de uso diário da cloroquina</i> .....	62
3.1.4.2	<i>Preparo das soluções de trabalho de uso diário da primaquina</i> .....	64
3.1.4.3	<i>Preparo das soluções de trabalho de uso diário da mefloquina</i> .....	65
3.1.4.4	<i>Preparo das soluções de trabalho de uso diário da lumefantrina</i> .....	66
3.1.5	Preparo da solução estoque do padrão interno carbamazepina .....	69
3.1.5.1	<i>Preparo da solução de trabalho do padrão interno carbamazepina</i> .....	69
3.1.6	Preparo da solução estoque das substâncias interferentes cafeína e nicotina .....	69
3.1.6.1	<i>Solução padrão estoque de cafeína 1 mg/mL</i> .....	70
3.1.6.2	<i>Solução padrão estoque de nicotina 1 mg/mL</i> .....	70
3.1.6.3	<i>Preparo da solução de trabalho dos fármacos concomitantes/interferentes</i> .....	70
<b>3.2</b>	<b>Validação do método bioanalítico</b> .....	<b>71</b>
3.2.1	Infusão dos compostos no espectrômetro de massas .....	71
3.2.2	Linearidade .....	72
3.2.3	Protocolo de validação do método bioanalítico .....	72
3.2.3.1	<i>Teste de quantificação Inicial (TQI)</i> .....	73
3.2.3.2	<i>Teste de estabilidade em condições de análise (TEBCA)</i> .....	73
3.2.3.3	<i>Teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP)</i> .....	74
3.2.3.4	<i>Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e degelo (TEBCD)</i> .....	74
3.2.3.5	<i>Teste de estabilidade de longa duração (TEBLD)</i> .....	75
3.2.3.6	<i>Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise (TEBSCA)</i> .....	75



3.2.3.7	Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA) ..	76
3.2.3.8	Teste de seletividade (TSE) .....	76
3.2.3.9	Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes (TSEFC) .....	77
3.2.3.10	Teste de efeito de matriz (TEM) .....	77
3.2.3.11	Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes (TEMFC) .....	78
3.2.3.12	Teste de efeito residual (TER) .....	78
3.2.3.13	Teste de precisão e exatidão (TPE) .....	79
<b>3.3</b>	<b>Análise das amostras em matriz biológica dos indivíduos em tratamento contra a malária .....</b>	<b>80</b>
3.3.1	Caracterização da população do trabalho .....	80
3.3.2	Transporte e armazenagem das amostras em matriz biológica .....	80
3.3.3	Tempos de coleta dos indivíduos sob tratamento da malária .....	81
3.3.4	Preparo das corridas analíticas de amostras de indivíduos sob tratamento da malária .....	81
<b>3.4</b>	<b>Avaliação dos resultados bioanalíticos referentes às amostras dos indivíduos do estudo em tratamento contra a malária para a verificação da adesão ao tratamento.....</b>	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Desenvolvimento do método bioanalítico .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2</b>	<b>Método bioanalítico desenvolvido .....</b>	<b>92</b>
4.2.1	Condições finais dos íons precursores e produtos monitorados por CLAE-EM/EM .....	92
4.2.2	Condições cromatográficas .....	95
4.2.3	Linearidade .....	95
4.2.4	Tempos de coleta .....	96
4.2.5	Procedimento de coleta e manuseio das amostras biológicas em papel filtro .....	96
4.2.6	Procedimento de extração das amostras em matriz biológica adsorvida em papel filtro .....	97
4.2.7	Preparo e extração dos controles de qualidade e amostras de tempos de coleta de indivíduos submetidas ao procedimento de diluição .....	98
<b>4.3</b>	<b>Validação do método bioanalítico .....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Resultados da validação do método bioanalítico .....	99
4.3.2	Estabilidade do analito em matriz biológica .....	99
4.3.2.1	Teste de quantificação Inicial (TQI) .....	100
4.3.2.2	Teste de estabilidade em condições de análise (TEBCA) .....	105

4.3.2.3	Teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP) .....	107
4.3.2.4	Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e degelo (TEBCD) .....	108
4.3.2.5	Teste de estabilidade de longa duração (TEBLD) .....	111
4.3.3	Estabilidade do analito em solução .....	112
4.3.3.1	Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise (TEBSCA) .....	113
4.3.3.2	Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA) ..	113
4.3.4	Teste de seletividade (TSE) .....	116
4.3.5	Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes (TSEFC) .....	118
4.3.6	Teste de efeito de matriz (TEM) .....	121
4.3.7	Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes (TEMFC) .....	122
4.3.8	Teste de efeito residual (TER) .....	123
4.3.9	Teste de precisão e exatidão (TPE) .....	126
4.4	<b>Aplicação do método desenvolvido e validado na análise das amostras em matriz biológica dos indivíduos em tratamento contra a malária para a avaliação da adesão do tratamento.....</b>	<b>133</b>
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>137</b>
	<b>APÊNDICE A - DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>146</b>
	<b>ANEXO A - RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 .....</b>	<b>153</b>
	<b>ANEXO B - NOTA TÉCNICA 04/2014 .....</b>	<b>165</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária, também conhecida como paludismo, é uma doença infecciosa parasitária muito antiga. Os primeiros registros desta enfermidade são datados de 3000 a.C. por meio de identificação de sintomas peculiares desta doença a partir de achados de escrita chinesa e egípcia em escavações arqueológicas. Nos registros médicos brasileiros é possível identificá-la do século XVI até os dias atuais (CAMARGO, 2003).

A denominação “malária” é derivada de termos italianos “mal” (mau) e “aria” (ar), ou seja, “ar ruim” uma vez que os povos antigos acreditavam que a transmissão da doença se dava por componentes nocivos presentes no ar, em certos períodos do ano.

Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, um médico militar francês em missão na Argélia, descobriu que a malária, doença então praticamente desconhecida na época, era na verdade uma doença parasitária, onde foi isolado em trabalhos posteriores o protozoário responsável pela enfermidade. Com a descoberta, Laveran recebeu o Prêmio Nobel em 1907 (HAAS, 1999).

Em 1890, os pesquisadores italianos Giovanni Battista Grassi e Raimondo Feletti, através de seus trabalhos, também comprovaram que a malária era causada por um protozoário e que o ciclo de vida deste microorganismo era dependente de mosquitos do gênero dos anofelinos. Nesse ano, foram descritas e catalogadas duas espécies diferentes de *Plasmodium*, o *P. vivax* e o *P. malariae*.

Em 1897, o pesquisador americano William H. Welch, descreveu em seus trabalhos, uma terceira espécie de protozoário causador da malária, o *P. falciparum* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

John William Watson Stephens, em 1922, observou ao estudar caracteres morfológicos das formas assexuadas dos protozoários presentes no sangue de um paciente com suspeita de malária, na África Oriental, que as características encontradas não eram compatíveis com as espécies de *Plasmodium* descritas anteriormente. Sendo assim, Stephens sugeriu a criação de uma nova espécie para o *Plasmodium* observado. Em 1927 e 1930, com a colaboração de outros pesquisadores, estudos foram realizados com pacientes na Nigéria e Stephens percebeu que as características observadas, em 1922, também foram encontradas

em alguns destes pacientes. Estas observações levaram a obtenção de mais dados que puderam comprovar a descrição da nova espécie encontrada e classificada em 1933 como *P. ovale* (JAMES et al, 2009).

Giuseppe Franchini, sucessor de Charles Louis Alphonse Laveran no laboratório de parasitologia do Instituto Pasteur, observou em 1927, ao examinar amostras de sangue provenientes de macacos do gênero *Macaca fascicularis*, que existiam diferenças significativas entre as espécies conhecidas na época capazes de infectar primatas selvagens. Franchini propôs a descrição de uma nova espécie de *Plasmodium*, que foi amplamente estudada por Robert Knowles, em 1932, como parte do tratamento para neurosífilis em humanos. Na ocasião, Knowles infectava humanos com *Plasmodium* proveniente de primatas selvagens através do sangue e sugeriu que poderia ser possível a transmissão zoonótica do parasita. A espécie então foi descrita de maneira mais detalhada juntamente com seu assistente Biraj Mohan Das Gupta e posteriormente por Sinton e Mulligan em 1937, ganhando status de importância médica apesar de não haver ainda um nome definitivo para o parasita. Esta prática foi amplamente utilizada para o tratamento de neurosífilis até 1955, onde o *Plasmodium* era utilizado como agente pirético (COLLINS, 2012).

Em 1957, Garnham e colaboradores, através de seus trabalhos, comprovaram que a espécie descrita por Knowles era de fato capaz de causar malária endêmica em humanos de maneira natural, onde o primeiro caso descrito foi em 1965 após um militar americano retornar de missão em florestas na Malásia. Em um primeiro momento foi apontada uma infecção por *P. falciparum* ou *P. malarie*, porém após a inoculação do parasita presente no militar para um macaco do gênero *Rhesus*, confirmou-se a evolução da doença no primata e o diagnóstico foi dado como a “malária de Knowles”. Esta espécie descrita por Sinton e Mulligan no final da década de 30 foi reconhecida e catalogada como *P. knowlesi*, em homenagem aos trabalhos do Dr. Robert Knowles (WHITE, 2008).

### 1.1 Ciclo biológico da malária

Todas as espécies do gênero *Plasmodium* que infectam o homem apresentam praticamente o mesmo ciclo de vida. O parasita possui uma fase sexuada exógena, com multiplicação no estômago e posterior migração para as glândulas salivares de mosquitos do gênero *Anopheles* e uma fase endógena, onde

ocorre multiplicação no hospedeiro humano. Após infectar um hospedeiro humano, o *Plasmodium* possui duas etapas de desenvolvimento, a primeira nas células do parênquima hepático e a seguinte no interior dos eritrócitos (FRANÇA et al, 2008).

## 1.2 Ação dos agentes antimaláricos

Atualmente, os fármacos utilizados no combate da infecção por malária são baseados em compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40, assim como também por produtos naturais. As substâncias são específicas para cada etapa do parasita infectante e de seu respectivo ciclo de vida, e são administradas de acordo com esquemas pré-estabelecidos por órgãos responsáveis pela administração de cada país e suas regiões endêmicas.

São utilizados fármacos eritrocíticos, que atuam nas formas do *Plasmodium* presentes no eritrócito humano, os fármacos gametocísticos, com sua utilização indicada para a atuação contra as formas sexuadas do parasita e as substâncias esporonticidas, capazes de combater os parasitas antes que os mesmos possam entrar na corrente sanguínea após a picada do mosquito, ou ao término do ciclo hepático (FRANÇA et al, 2008).

Além da classificação dos fármacos por alvo de ação no parasita, estes também podem ser classificados por suas características químicas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). São os chamados arilaminoálcoois, a quinina, mefloquina e halofantrina; 4-aminoquinolinas a cloroquina e amiodaquina; 8-aminoquinolinas a primaquina; os peróxidos de lactona sesquiterpênica as substâncias derivadas da artemisinina, as naftoquinonas a atovaquona e os antibióticos de uso concomitante a tetraciclina, doxiciclina e clindamicina (OMS, 2015).

A classificação dos principais fármacos antimaláricos encontra-se correlacionada quanto a sua categoria química e mecanismo de ação antiparasitária na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos principais fármacos antimaláricos.

Fármaco antimalárico	Classificação química	Alvo de ação
Cloroquina	4-aminoquinolina	Esquizonticida sanguíneo
Primaquina	8-aminoquinolinas	Gametocitocida
Mefloquina	4-metanolquinolinas	Esquizonticida sanguíneo
Quinina	4-metanolquinolinas	Esquizonticida sanguíneo
Artesimina	Lactona sesquiterpênica	Esquizonticida sanguíneo
Proguanil	Biguaninas	Esquizonticida tecidual
Pirimetamina	Diaminopirimidas	Esquizonticida tecidual
Lumefantrina	Diclorobenzilidinas	Esquizonticida sanguíneo

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

### 1.3 A malária no mundo

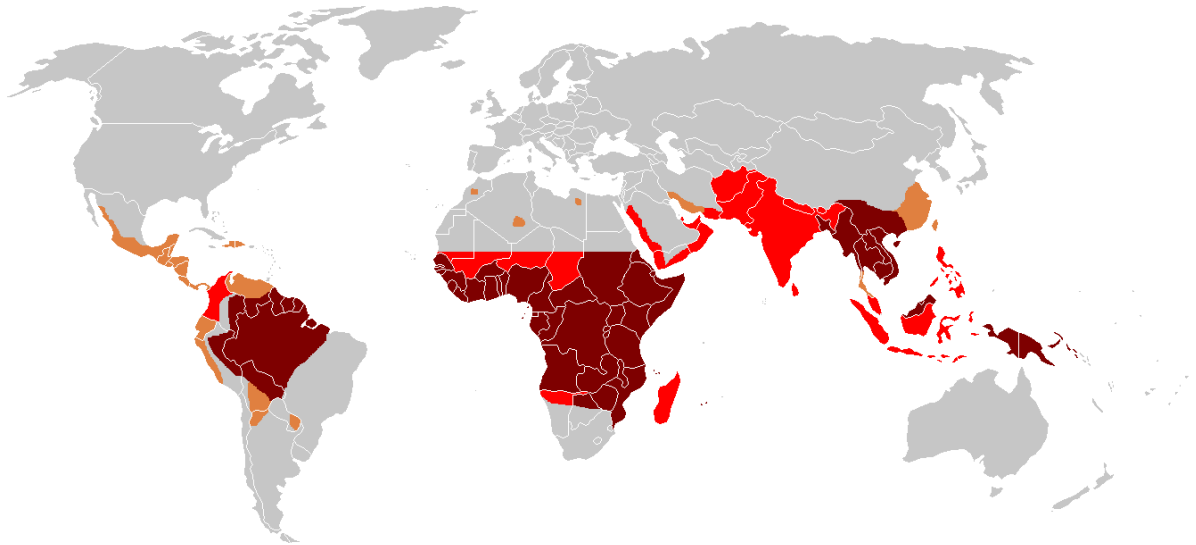
A malária é uma doença com distribuição em áreas predominantemente tropicais e sub-tropicais dos países em desenvolvimento (Figura 1). Como áreas de disseminação da doença, podemos destacar grandes áreas da África, América Central e do Sul, a ilha de Hispaniola (que engloba os países do Haiti, Jamaica e República Dominicana), Ásia (incluindo o Subcontinente Indiano, Sudeste Asiático e no Oriente Médio), Europa Oriental, e do Sul do Pacífico, regiões essas que contabilizam 97 países com casos de ocorrência da malária (OMS, 2015).

Atualmente a malária em humanos é causada por cinco espécies de protozoários conhecidos pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Quatro delas - *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* - são espécies pertencentes ao tipo de malária humana que se propaga através de um indivíduo para outro através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Este gênero possui cerca de 400 espécies diferentes, mas apenas 30 destas espécies são vetores de grande importância médica (OMS, 2015).

Nos últimos anos, foram notificados casos de malária humana causada pela contaminação por protozoários da espécie *P. knowlesi*. Infecções como esta são raras, uma vez que esta espécie é causadora de malária entre macacos em certas áreas florestais do sudeste da Ásia. Informações atuais sugerem que a malária causada através do *P. knowlesi* não é transmitida por vetores entre seres humanos infectados e sadios. Acredita-se que a infecção somente ocorra em pessoas quando

um mosquito *Anopheles* sp. se contamina com um macaco infectado e depois através da alimentação de sangue, infecte seres humanos (transmissão zoonótica) (VAN HELLEMOND et al, 2009).

Figura 1 - Mapa da distribuição da malária no mundo.



Nota: No mapa, podemos observar a presença de malária multi-resistente em marrom; malária resistente a cloroquina em vermelho; malária não resistente em bege e regiões com ausência de malária em cinza.

Fonte: (NATIONAL MALARIA CONTROL PROGRAMME REPORTS, 2014).

Estimativas realizadas anualmente pela *Malaria Foundation International* (MFI) revelam que pelo menos 40% da população mundial (aproximadamente 3 bilhões de indivíduos) estaria exposta, em algum momento de sua vida, ao risco de contrair o paludismo (MALARIA FOUNDATION INTERNATIONAL, 2015).

Conforme mencionado anteriormente, existem atualmente cinco espécies conhecidas de protozoários do gênero *Plasmodium* capazes de infectar os seres humanos. Atualmente, de acordo com o Ministério da Saúde (MS), um exame de sangue por microscopia de gota espessa, corada pelo método de Walker é considerado o padrão-ouro para a detecção e identificação dos parasitos causadores da malária (MS, 2015). Este procedimento é utilizado com o objetivo de identificar e diferenciar a espécie do protozoário responsável por causar a infecção da malária, bem como de permitir a visualização do estágio de evolução do parasito circulante. É de fundamental importância médica que esse exame seja realizado adequadamente, pois dessa forma, o paciente poderá ser orientado com precisão sobre qual o melhor esquema terapêutico a ser utilizado, bem como a melhor

medida de tratamento para a infecção. Nesse cenário uma tentativa de minimizar a adaptação evolutiva de *Plasmodium* Spp., estaria sendo realizada, já que o processo de seleção natural dos parasitos levaria ao desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados atualmente, uma vez que, o protozoário já é conhecido por apresentar resistência a alguns fármacos utilizados no passado como forma primária do tratamento desta enfermidade. Desse modo, a fim de que se possa evitar a necessidade de investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta doença, é realizado o tratamento em pacientes de malária utilizando os fármacos existentes atualmente na forma de esquemas terapêuticos combinados, onde após o diagnóstico do exame da gota espessa e de seu posterior resultado, duas ou mais substâncias podem ser designadas para o tratamento da doença (figuras 2, 3, 4, 5 e 6) (MS, 2010).

Classificando os tipos de infecção por regiões ao redor do mundo, observa-se a infecção pelo *P. falciparum*, também conhecida como malária grave ou maligna, que ocorre em todas as regiões tropicais do mundo; a malária causada pelo *P. vivax*, chamada de malária benigna é muito comum em regiões da América do Sul e também pode ser considerada como a variação da malária mais largamente distribuída e observada em regiões temperadas do mundo; a infecção por *P. malariae*, tem a distribuição geográfica muito menos difundida e ocorre em zonas mais restritas como partes da África e Ásia; a enfermidade causada pela transmissão do *P. ovale* ocorre quase exclusivamente na África, e por fim, temos a infecção pela subespécie mais recentemente descoberta do protozoário, a malária causada pela infecção pelo *P. knowlesi* observada em áreas do Sudeste Asiático (SRINIVAS, 2015).



Figura 2 - Tratamento das infecções causadas por *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina em 3 dias e primaquina em 7 dias (esquema curto).

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1-3 anos 10-14 kg	1	2	1/2	1	1/2	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
≥ 15 anos ≥ 50 kg	4	2	3	2	3	2	2

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 3 - Tratamento das infecções por *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 dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6-11 meses 5-9 kg	1/2	1/2	1/4	1/2	1/4	1/2	1/4
1-3 anos 10-14 kg	1	1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
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	1/2	2	1/2	2	1/2	1/2
12-14 anos 35-49 kg	3	1	2	1	2	1	1/2
≥ 15 anos ≥ 50 kg	4	1	3	1	3	1	1

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010).

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

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

Fonte: (Ministério da Saúde, 2010).

Figura 5 - Tratamento das infecções por *P. falciparum* com a combinação fixa de artemeter + lumefantrina em 3 dias.

Idade/Peso	Número de comprimidos						
	1º dia		2º dia		3º dia		
	Manhã		Noite	Manhã	Noite	Manhã	Noite
	Artemeter + Lumefantrina	Primaquina comp 15mg	Artemeter + Lumefantrina				
6m-2 anos <b>5-14 kg</b>	1	1/2	1	1	1	1	1
3-8 anos <b>15-24 kg</b>	2	1	2	2	2	2	2
9-14 anos <b>25-34 kg</b>	3	1 e 1/2	3	3	3	3	3
≥ 15 anos <b>≥ 35 kg</b>	4	3	4	4	4	4	4

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 6 - Tratamento das infecções por *P. falciparum* com a combinação fixa de artemeter + lumefantrina em 3 dias.

Idade/ Peso	Número de comprimidos por dia						
	1º dia		Primaquina comp 15mg	2º dia		3º dia	
	Artesunato + Mefloquina			Infantil	Adulto	Infantil	Adulto
	Infantil	Adulto					
6-11 meses <b>5-8 kg</b>	1		1/2	1		1	
1-5 anos <b>9-17 kg</b>	2		1	2		2	
6-11 anos <b>18-29 kg</b>		1	1 e 1/2		1		1
≥ 12 anos <b>≥ 30 kg</b>		2	3		2		2

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

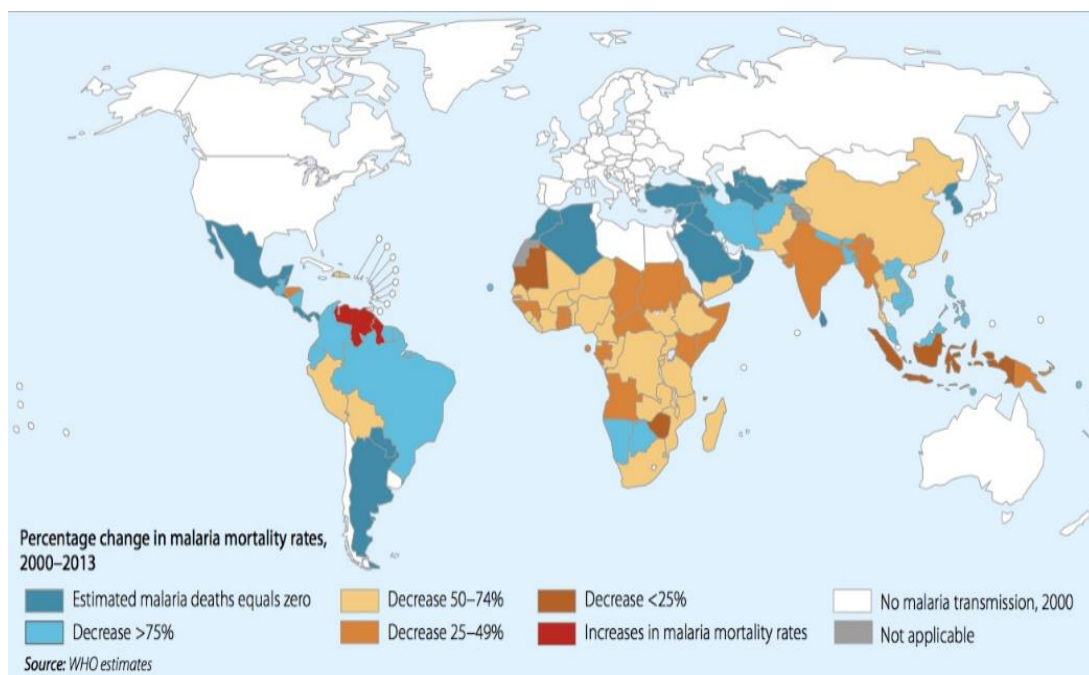
Mesmo sendo negligenciada há anos, relatórios atuais sobre a situação global da malária apontam que essa doença continua seguindo o panorama observado no início do século XXI (OMS, 2008). Até o ano de 2013, observou-se a queda da taxa de mortalidade em relação ao número de casos confirmados em toda a região considerada de incidência de malária a nível global, ainda que os números sejam bastante elevados, principalmente se for levado em consideração o registro de novos casos (Figura 7). Porém ainda há escassez de financiamento por parte das autoridades competentes no que diz respeito a práticas utilizadas para o combate desta doença negligenciada. Em 2012, foram investidos por países desenvolvidos US\$ 2,5 bilhões no combate à doença nas áreas do continente africano, conhecidas por possuírem a maior taxa de mortalidade por malária do mundo. (OMS, 2015). Esse valor correspondeu a metade do que se deveria ter sido utilizado nos esforços mundiais para o combate e erradicação desta enfermidade. Estes dados sugerem que a malária ainda é uma grande ameaça, particularmente na África e no sudeste da Ásia, porém a recente melhora nestes indicadores apresentados, como a redução da taxa de mortalidade em decorrência da contaminação por malária, no início do século XXI é um resultado muito surpreendente para uma doença que tem sido negligenciada e abandonada por vários anos (OMS, 2015).

O controle da malária ao longo dos anos contou com vários planos de erradicação por parte de governos locais, assim como da ajuda de órgãos competentes globais. Aliado a isso, houveram vários avanços tecnológicos e científicos nas áreas de diagnóstico, tratamento, constatações epidemiológicas e

terapêuticas sobre esta enfermidade. Mesmo assim, diante de inúmeros avanços tanto na área de pesquisa clínica, quanto nas áreas de imunologia, fisiopatologia, biologia molecular, desenvolvimento de novos fármacos e esquemas de tratamento, não se observou avanço significativo no plano de erradicação da malária de maneira global e local. Muito dessa deficiência ao longo dos anos no combate dessa enfermidade pode ser justificada, devido a grande quantidade de indivíduos doentes presentes nas áreas endêmicas, dessa forma mantendo ativo o protozoário por um período maior de tempo, viabilizando a transmissão da doença e a mantendo endêmica por ainda mais tempo (BARROSO, 2001).

A região conhecida como África Tropical, localizada ao sul do deserto do Saara, concentra aproximadamente 80 % dos casos registrados de malária no mundo, sendo que deste número, 90 % dos casos são fatais, em virtude de não existirem programas de controle realmente eficientes para o combate da epidemia, associado a presença de formas mais agressivas da doença. Em períodos de reincidência de ebola, por exemplo, outra enfermidade que afeta este continente, os números de casos de malária aumentam devido a transferência de esforços por parte das autoridades competentes para o combate dessa outra enfermidade (ONU, 2015).

Figura 7 - Alteração na taxa de mortalidade por malária no mundo.



Fonte: (OMS, 2013).

Mesmo com uma ampla área de distribuição da doença ao redor do mundo, no ano de 1992 na Conferência Ministerial de Amsterdam sobre a Malária, foi decidido entre os países mais ricos do mundo que o objetivo de erradicação global da malária seria abandonado e seria realizado o controle integrado da doença, onde as medidas preventivas deveriam ser adequadas às diferentes situações epidemiológicas presentes nas diversas regiões endêmicas da doença. Esta nova estratégia entende a doença como resultante de múltiplos fatores determinantes, não apenas como de natureza biológica e ecológica como também econômicos, sociais e culturais. Outras medidas, além de se combater o vetor e o parasita foram tomadas como o desenvolvimento dos sistemas de saúde locais, estruturados e atuante, além da capacitação de pessoal (OMS, 2015).

No início de 2017, a OMS divulgou um relatório sobre o controle da malária atualizado com os dados de 2016 e alertou que a malária ainda permanece como um grave problema de saúde pública principalmente na África Subsaariana (WORLD MALARIA REPORT, OMS, 2016).

O documento indica que as mortes, em consequência da doença, caíram 30% desde 2010, mas, que em 2015, ainda morreram no mundo cerca de 429 mil pessoas, com países como a Nigéria e República Democrática do Congo contendo a mais alta taxa de mortalidade registrada, porém Moçambique e Angola despertaram preocupação das autoridades sanitárias nos últimos dois anos (RUBIRA, 2017).

Nesse contexto, instrumentos de vigilância, ações articuladas entre as diferentes instâncias de governo e instituições envolvidas para garantir a saúde, criando mecanismos seguros de controle e regulação, bem como a participação da população, informada sobre a importância da prevenção, diagnóstico e tratamento da infecção são indispensáveis. Sendo assim, a integração das ações de luta contra a malária realizadas em cada região endêmica da doença seria responsável por um combate eficaz desta enfermidade negligenciada a anos (FRASSON et al, 2009).

#### **1.4 A malária no Brasil**

No Brasil, existe a ocorrência de três dessas cinco espécies conhecidas de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Segundo dados do MS através da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em 2014, 99,9 % dos casos de ocorrência da doença se concentraram na região amazônica, considerada uma área endêmica no

país. A forma mais agressiva da doença causada pelo *P. falciparum* é a mais comum entre os infectados (FIOCRUZ, 2013).

Em uma tentativa de erradicação da malária, o governo brasileiro criou em 1965, através da lei 4.709, de 6 de setembro de 1965, a Campanha de Erradicação da Malária (CEM). A CEM tinha autonomia administrativa e financeira, quadro de pessoal e orçamento próprio, com capacidade técnica e operacional para executar suas ações de cobertura integral das medidas de controle em todas as áreas endêmicas do país (SILVA e PAIVA, 2015).

Durante o período de vigência da CEM de 1967 a 1969 elevou-se o número dos exames realizados ao mesmo tempo em que houve uma diminuição no número dos exames positivos, o que revelou um certo impacto do programa na saúde pública brasileira, em comparação ao que era realizado no passado (SILVA e PAIVA, 2015). Porém, diversos fatores contribuíram para o insucesso deste programa, onde pode-se apontar como um dos principais, a reutilização da mesma estratégia da década de 50, baseada na utilização do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) em larga escala como principal forma de combate ao mosquito e a administração de cloroquina no tratamento de pessoas doentes, onde já se podia observar os primeiros sinais de resistência do *P. falciparum* a este fármaco. Pode-se também citar como fatores secundários, a ausência de infraestrutura social e de serviços permanentes de saúde na grande maioria dos municípios afetados na região norte do Brasil, a presença massiva da floresta tropical úmida, favorecendo o desenvolvimento e proliferação dos vetores da doença (mosquitos anofelinos) e dos protozoários causadores de malária, principalmente no que diz respeito a alta incidência de *P. falciparum* resistente aos antimaláricos seguros para uso no campo (LOIOLA et al, 2002).

Reconhecida a falha na estratégia do combate da malária, em 1970 foi criado um novo órgão que seria responsável não só por fazer a campanha para combater o paludismo, mas também por todas as outras enfermidades de interesse à saúde pública, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública, SUCAM.

A SUCAM foi originada da fusão do Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu), da Campanha de Erradicação da Malária (CEM) e da Campanha de Erradicação da Varíola (CEV) e tinha como finalidade o controle ou erradicação das grandes endemias no Brasil, desenvolvendo como principais quatro Programas de Controle de Doenças: chagas, malária, esquistossomose e febre amarela, bem

como cinco campanhas contra: a filariose, o tracoma, a peste, o bócio endêmico e as leishmanioses. Possuía em todas as unidades federadas diretorias regionais, que tinham em sua estrutura distritos sanitários, totalizando oitenta em todo o país, sendo essas as unidades responsáveis pela operacionalização de atividades de campo (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2011).

Apesar de possuir grande eficiência na área de atuação no combate a endemias e estar presente em todos os estados do país, em 1991 um decreto do então presidente da república, Fernando Collor de Melo, determinou o fim da SUCAM e a incorporação de suas atividades pela recém-criada Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) um ano antes em 1990. Muitos estudiosos consideraram esta decisão do governo um tanto quanto equivocada, uma vez que a SUCAM possuía mão de obra qualificada e treinada, sendo considerados verdadeiros especialistas no combate a endemias, o que não foi visto com o seguimento das atividades pela FUNASA. Historicamente, dados revelam que após o fim da SUCAM, inúmeras endemias que estavam em declínio no Brasil, apresentaram um aumento significativo no número de infectados por parasitas dependentes de vetores, como por exemplo a dengue e a febre amarela, além da malária (HOCHMAN et al, 2007; LOIOLA et al, 2002).

No Brasil, desde o ano de 1987, são notificados aproximadamente 500 mil casos de infecção por malária por ano, porém este número deve ser ainda maior do que o registrado, pois muitos casos não são notificados às autoridades sanitárias legais. Estes casos não notificados se devem muitas das vezes a áreas com grande dificuldade de acesso geográfico e assistencial na Amazônia, a questão da desinformação sobre a doença e a cultura da automedicação presente nos hábitos dos brasileiros (BARROSO, 2001).

Tendo como base que as primeiras iniciativas de controle empregado pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), consistiram na utilização de mosquiteiros e agentes encarregados da aplicação de inseticidas visando o combate e controle dos mosquitos transmissores, o objetivo principal do PNCM não foi alcançado devido à grande proliferação dos vetores. Atualmente o programa visa o tratamento total dos doentes para que o mosquito não se contamine com o protozoário e se torne vetor da doença (MS, PNCM, 2015).

Na ausência de uma vacina efetiva contra a malária, programas de quimioprofilaxia e a quimioterapia são as únicas armas capazes de controlar e

combater os parasitas da malária (ALENCAR et al, 1982), porém estes programas de tratamento não têm sido adotados de maneira coletiva devido à alta resistência conhecida do *P. falciparum* a cloroquina, fármaco de primeira escolha do tratamento, sendo necessário a notificação do caso, e a possível identificação do parasita envolvido, para determinar o esquema de tratamento a ser empregado. Os tratamentos atuais se baseiam na terapia combinada por artemisinina (ACT) objetivando a não formação de cepas multirresistentes aos fármacos administrados no combate da doença. Outro ponto que contribuiu para a não adesão ao tratamento da malária em larga escala, é a alta toxicidade dos fármacos utilizados atualmente, provocando diversos efeitos colaterais aliado ao alto custo no desenvolvimento de novos fármacos (FRASSON et al, 2009).

Mesmo com toda a dificuldade encontrada pelas autoridades brasileiras ao longo dos anos, OMS registrou progressos no combate à malária em nível nacional, já que o Brasil registrou, em 2015, o menor número de casos de malária dos últimos 35 anos. Entre 2000 e 2015 houve uma redução de 89% dos casos da doença, o que garantiu com que nosso país tenha cumprido um dos objetivos do projeto de desenvolvimento do milênio da Organização das Nações Unidas (ONU), cuja proposta seria que para aquele período acontecesse uma redução de pelo menos 75% dos casos de malária nos países portadores de áreas endêmicas. Atualmente, o Brasil tem cerca de 140 mil casos confirmados anuais, número bem inferior - apenas para efeito de comparação - aos, aproximadamente, 600 mil casos contabilizados no começo do século (PORTAL DA SAÚDE DO SUS, 2016).

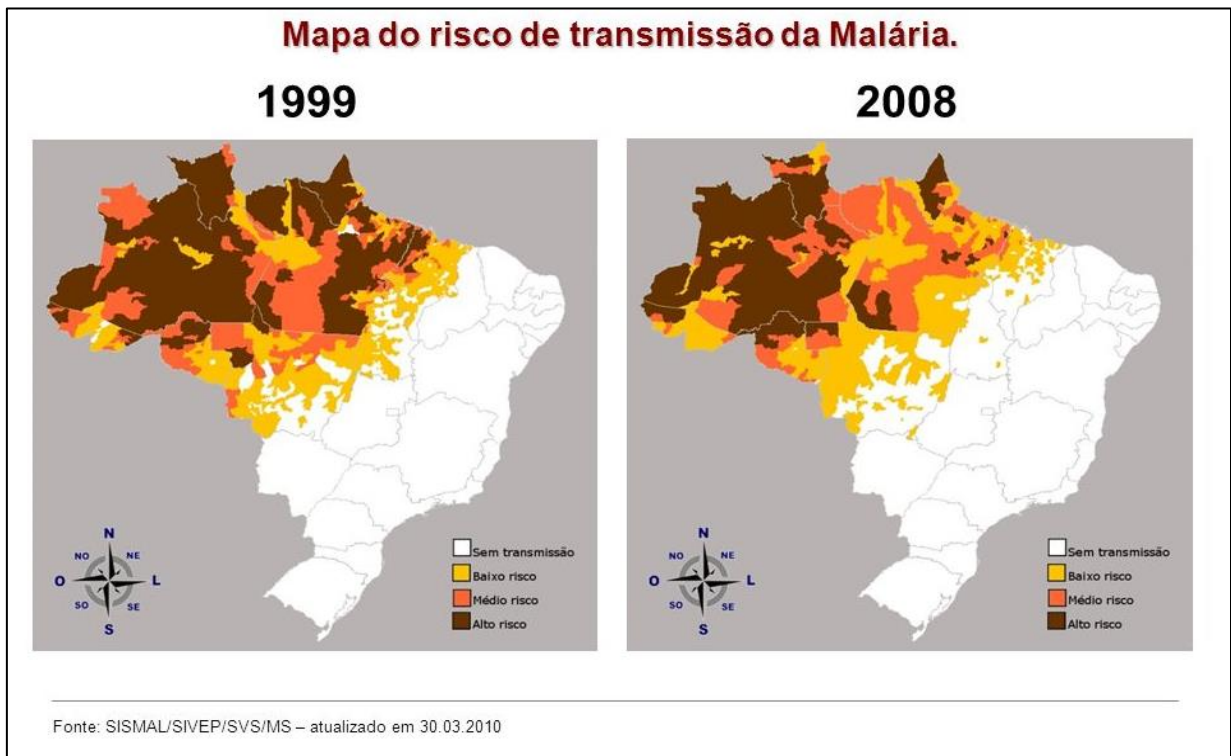
Em 2015, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Eliminação da Malária no Brasil, com ênfase na malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. A medida faz parte dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) lançados pela Organização das Nações Unidas (ONU) em substituição aos Objetivos do Milênio. A meta é a redução de pelo menos 90% dos casos até 2030 e da eliminação de malária em pelo menos 35 países (MS, 2016).

A prioridade é conscientizar as pessoas da região amazônica, a área endêmica responsável por 99% dos casos autóctones. Indivíduos que já tiveram a doença mais de uma vez e que não buscaram tratamento na rede pública de saúde, comprometem a redução dos casos e a interrupção na transmissão (PORTAL DA SAÚDE DO SUS, 2016).



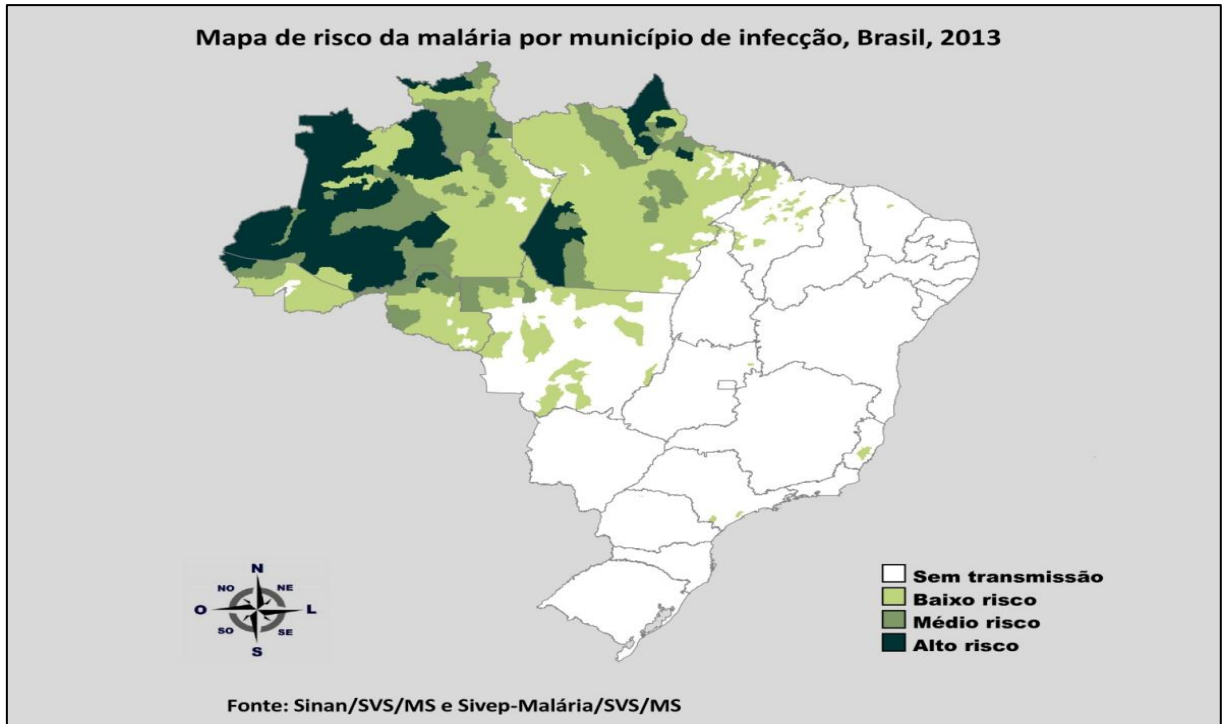
Sendo assim, de acordo com a análise de dados recentes do Ministério da Saúde (2016) e da Organização Mundial da Saúde (2017), observou-se que a malária no Brasil assim como no resto do mundo, também sofreu uma leve queda no número de casos confirmados na virada do século XX para o século XXI (Figura 8). Porém, esse resultado por mais que seja positivo, não é significativo para um país de tamanho continental como o Brasil. A malária ainda é considerada uma doença negligenciada e mesmo os esforços para o seu controle ainda carecem de melhor entendimento e participação por parte da população. As figuras 9 e 10, ilustram a região norte como a mais afetada pela malária, se mantendo como a grande área endêmica do país.

Figura 8 - Mapa de áreas de risco para a transmissão da malária no Brasil.



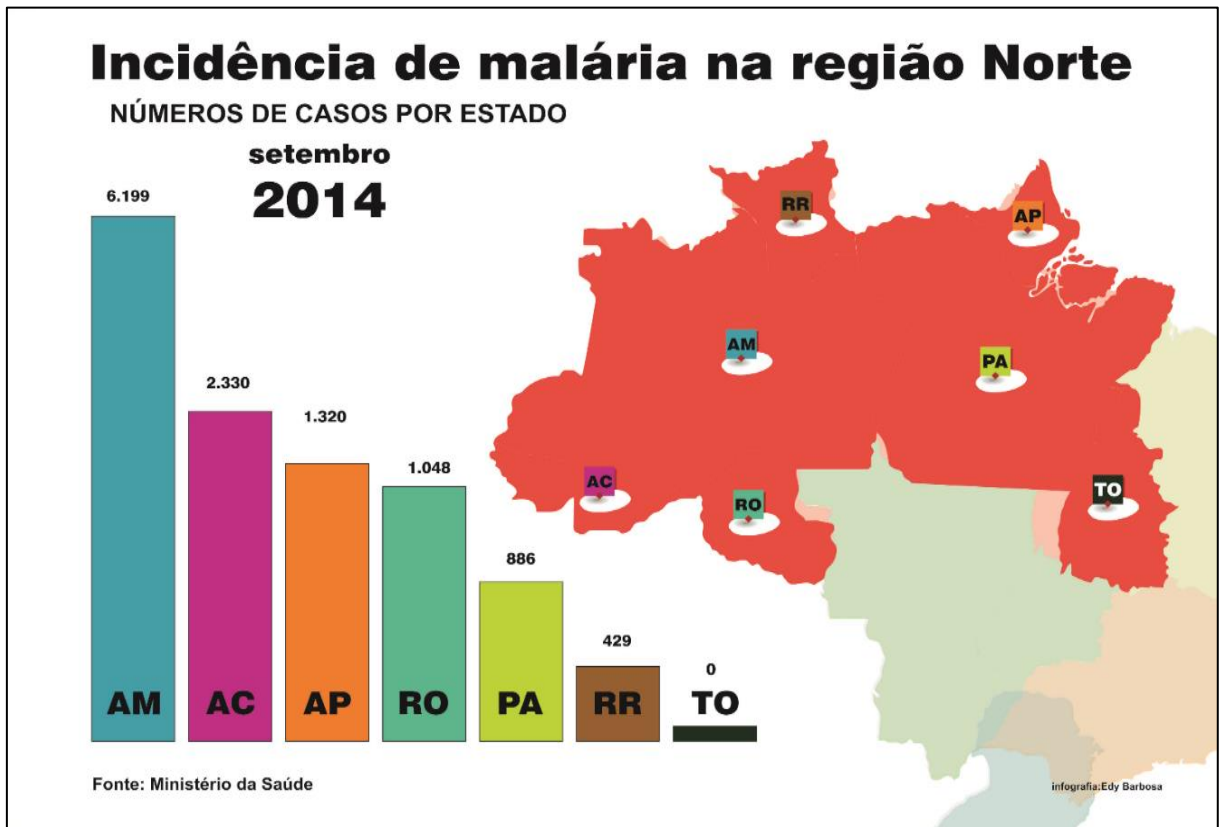
Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 9 - Área atual considerada endêmica da malária no Brasil.



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Figura 10 - Número de casos de malária na região norte do Brasil.



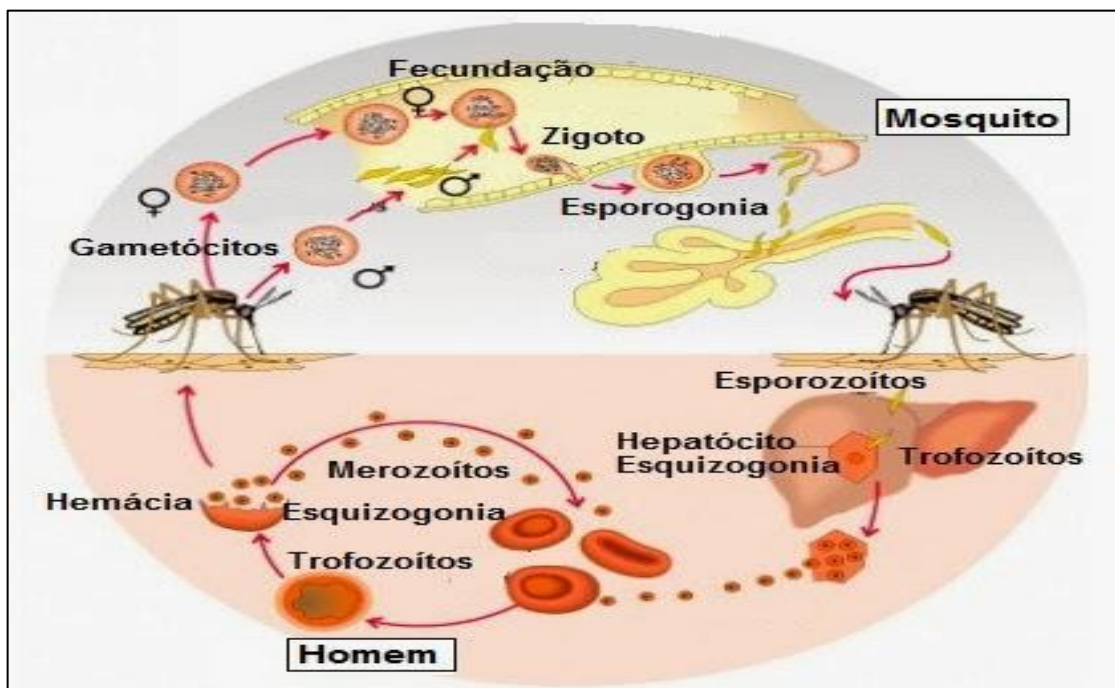
Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo Rubira (2017), existe um risco real do Brasil enfrentar um aumento significativo de indivíduos infectados não só com malária, mas com outras doenças infecciosas após a recente aprovação da PEC 55, que limita os gastos públicos, pois um “desinvestimento” em saúde pública, pode colocar em risco o trabalho de controle da malária realizado por várias décadas, a exemplo do que já aconteceu na Venezuela e no Peru.

### 1.5 Principais antimaláricos utilizados no Brasil

A malária pode ser tratada com medicação de uso oral. O tratamento mais eficaz para a infecção é o uso de artemisinina combinada com outros fármacos antimaláricos como a cloroquina, primaquina, lumefantrina, mefloquina, artesunato e/ou arteméter, denominada de terapia combinada de artemisinina, ACT, que é eficaz em 90% desses casos. Esta combinação de fármacos diminui a chance de sobrevivência e evolução do parasita para que o mesmo não possa se tornar resistente a qualquer um dos componentes individuais do tratamento. Estes fármacos administrados em um determinado esquema de tratamento são específicos para cada etapa do ciclo de vida de *Plasmodium* sp. (Figura 11) (CORTOPASSI et al, 2011).

Figura 11 - Ciclo de vida do parasito da malária.



Fonte: (DIRETORIA MUNICIPAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010).

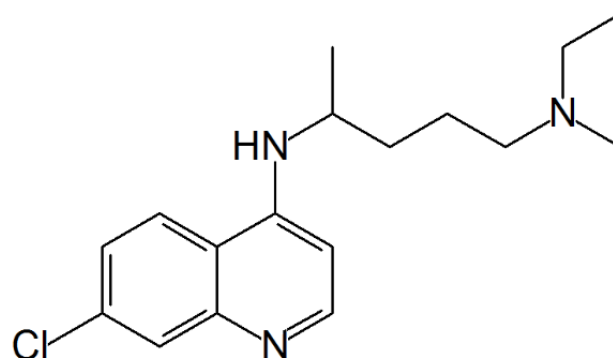
Os mecanismos de ação dos fármacos antimaláricos utilizados atualmente no Brasil ainda não foram totalmente elucidados, porém com base na literatura científica disponível, acredita-se que a cloroquina atue na forma eritrocítica do parasita juntamente com a mefloquina e a lumefantrina (KATZUNG, 2010; CUNICO et al, 2008; CORTOPASSI et al, 2011).

Esses fármacos atuam no vacúolo digestivo do *Plasmodium*, interferindo no mecanismo de neutralização ao radical livre *heme*, tóxico ao parasita. Já Pukrittayakamee et al, em 2004, sugeriram que a primaquina possua o seu mecanismo de atuação intercalando-se entre as bases nitrogenadas do DNA do parasita impedindo a replicação do material genético. Por esta razão, a área de atuação deste fármaco concentra-se no estágio sexual de *Plasmodium* spp.

### 1.5.1 Cloroquina

A cloroquina (4-N-(7-chloroquinolin-4-yl)-1-N,1-N-diethylpentane-1,4-diamine), figura 12, é uma substância da classe 4-aminoquinolina que pode inibir a desintoxicação do parasita pelo grupo heme, no interior dos eritrócitos. Pode também interferir com a biossíntese de ácidos nucleicos. Tem sua concentração máxima alcançada no interior do vacúolo digestivo do parasita. A resistência do *Plasmodium* spp. a esta substância se deve a mutações genéticas nos genes codificadores das proteínas da membrana do vacúolo digestivo do parasita (SLATER, 1993).

Figura 12 - Fórmula estrutural da cloroquina.



Fonte: (Do autor, 2016).

A cloroquina é rapidamente absorvida através do trato gastrointestinal após administração oral. Possui taxa de ligação com proteínas plasmáticas de aproximadamente 55 %. A substância é extensamente distribuída por tecidos e fluídos corporais, incluindo placenta e leite materno. É metabolizada pelo fígado através das enzimas CYP2C8 e CYP3A4, tendo como produto principal a monodesetilcloroquina, que possui atividade antimalárica similar a substância de origem. O fármaco é eliminado lentamente do organismo humano onde 55 % da sua eliminação é realizada pelos rins (OMS, 2015).

A tabela 2 resume os parâmetros farmacocinéticos da cloroquina em estudos onde a dose recomendada da substância para tratamento profilático é utilizada.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos da cloroquina.

Parâmetro	Valor
$C_{max}$ (ng/mL)	283 – 1430
$T_{max}$ (h)	2,7 – 6,9
$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu$ g.h/mL)	8,2 – 140
Eliminação $T_{1/2}$ (h)	108 – 291
Cl/f (L/h per kg)	0,23 – 0,80
Vd/f (L/kg)	31.8 – 262

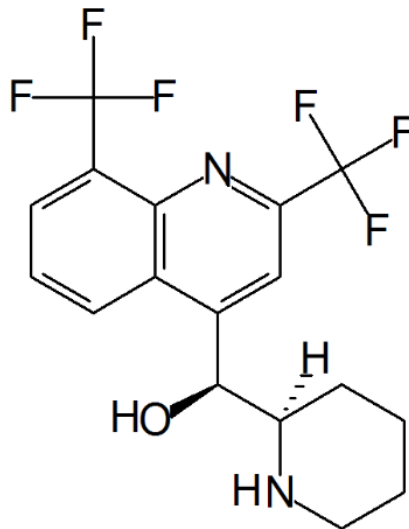
Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

### 1.5.2 Mefloquina

A mefloquina ((S)-[2,8-bis(trifluoromethyl)quinolin-4-yl]-[(2R)-piperidin-2-yl]methanol), figura 13, é indicada para a quimioprofilaxia da malária causada por todas as espécies de *Plasmodium*. Em combinação com o artesunato, também é indicada para o tratamento da malária não complicada (OMS, 2015).

Mefloquina é uma 4-metanolquinolina, que estruturalmente é relacionada a quinina e pertence à classe dos fármacos aril-amino álcool. Possui duas formas racêmicas a eritro-mefloquina e a tereo-mefloquina, cada um composto por um par de enantiômeros, onde a mistura racêmica da eritro-mefloquina tem maior atividade contra os parasitas da malária (DESJARDINS et al, 1979).

Figura 13 - Fórmula estrutural da mefloquina.



Fonte: (Do autor, 2016).

Seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido, porém acredita-se que esteja relacionado com a inibição do mecanismo de desintoxicação do grupamento heme pelo parasita, um mecanismo de ação comum a maioria dos antimaláricos do grupo quinolina. A teoria mais aceita atualmente mostra que a mefloquina inibe o mecanismo de endocitose pelo citosol do parasita.

A mefloquina possui a mesma especificidade de ação da quinina, combatendo principalmente os parasitas assexuados. A substância não possui atividade pré-eritrocítica conhecida atualmente (OMS, 2015).

A tabela 3 resume os parâmetros farmacocinéticos da mefloquina em estudos onde a dose recomendada da substância para tratamento profilático é utilizada.

Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos da mefloquina.

Parâmetro	Valor
C <sub>max</sub> (ng/mL)	1000 – 3279
T <sub>max</sub> (h)	15 – 72
AUC <sub>0-infinity</sub> (µg.h/mL)	12,8 – 63,6
Eliminação T <sub>1/2</sub> (h)	8,1 – 15,2
Cl/f (L/h per kg)	0,016 – 0,174
Vd/f (L/kg)	7,87 – 31,8

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

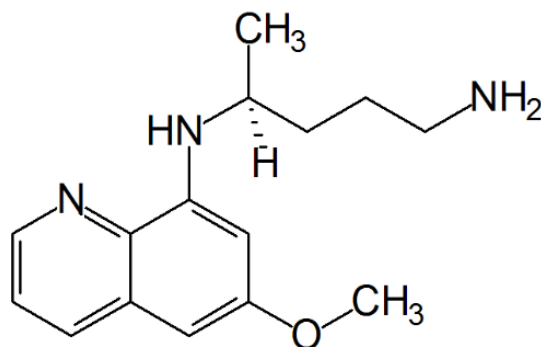
### 1.5.3 Primaquina

A primaquina (4-N-(6-methoxyquinolin-8-yl)pentane-1,4-diamine), figura 14, possui ação gametocítica e é indicada para o combate da malária causada pelo *P. vivax* ou *P. ovale* e para a prevenção de recaídas nestes casos. Pode ser utilizada também como fonte primária de tratamento para a malária causada pelo *P. falciparum* em áreas onde este parasita apresenta resistência aos medicamentos derivados da quinina (OMS, 2015).

Nos tratamentos da malária causada pelos *P. vivax* e *P. ovale* é utilizada concomitantemente com fármacos de ação esquizotônicas, normalmente com cloroquina ou com a terapia combinada de artemisinina (ACT) como forma de otimizar o tratamento (MS, 2010).

A primaquina é uma 8-aminoquinolina, altamente eficaz no combate contra formas exoeritrocíticas (hipnozoítas) e do estágio sexuado de todos os parasitas (gametócitos). Tem muito pouca atividade contra os estágios assexuados do *P. vivax* e ação insignificante contra o *P. falciparum* adulto, porém, seus gametócitos são neutralizados em poucas horas, impedindo a formação do oocisto e do esporozoíto (FRANÇA et al, 2008).

Figura 14 - Fórmula estrutural da primaquina.



Fonte: (Do autor, 2016).

O metabolismo hepático da primaquina produz compostos intermediários reativos, que causa a oxidação tóxica intracelular. O composto original, no entanto, não é reativo.

A substância é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal alcançando picos de concentração plasmáticas de 1 a 4 horas após a administração, com

biodisponibilidade total de aproximadamente de 96%. É metabolizada por duas rotas no organismo humano, a primeira rota é enzimática através da enzima monoamina oxidase, onde não possui atividade antimalárica, e pela via hepática CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 onde é convertida a carboxiprimaquina, tendo eliminação bastante lenta do organismo, o que faz a primaquina ser responsável pela atividade antimalárica (MARCISISIN et al, 2016). A primaquina e seu metabólito carboxiprimaquina são eliminados principalmente pelo trato biliar, assim como também é excretada inalterada pelas vias urinárias.

O mecanismo de ação da primaquina ainda não foi totalmente elucidado, porém, acredita-se que a carboxiprimaquina interfere no processo metabólico mitocondrial e no transporte de elétrons do parasito. Ainda não foram documentadas resistências adquiridas pelos parasitas na forma hipnozoitocida ou gametocítica.

A tabela 4 resume os parâmetros farmacocinéticos da primaquina em estudos onde a dose recomendada da substância para tratamento profilático é utilizada (OMS, 2015).

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos da primaquina.

Parâmetro	Valor
$C_{max}$ (ng/mL)	65 – 295
$T_{max}$ (h)	1,8 – 4,0
AUC <sub>0-infinity</sub> (µg.h/mL)	443 – 1978
Eliminação $T_{1/2}$ (h)	3,5 – 8,0
Cl/f (L/h per kg)	0,31 – 1,19
Vd/f (L/kg)	2,92 – 7,94

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

#### 1.5.4 Lumefantrina

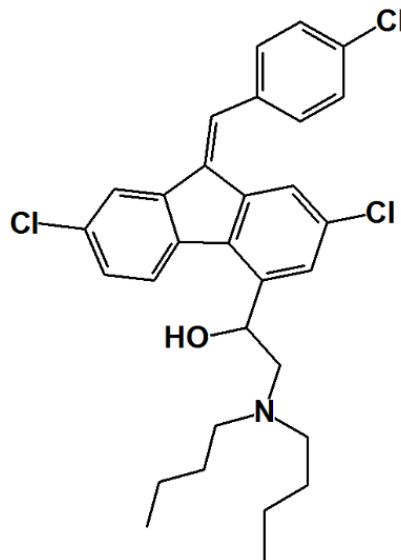
A lumefantrina (2-(dibutylamino)-1-[(9Z)-2,7-dichloro-9-[(4-chlorophenyl)methylidene]fluoren-4-yl]etanol), figura 15, é indicada para o tratamento da malária não complicada causada pelos *P. falciparum* ou *P. vivax*, também sendo efetiva contra os *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Pode ser utilizada como auxiliar para o tratamento da malária complicada, porém nunca como fonte primária de tratamento.



É uma substância fluorena derivada, pertencente ao grupo dos aril amino-álcool. Acredita-se possuir ação esquizotocida, ao reduzir a eficiência do funcionamento do vacúolo digestivo do parasita, evitando a desintoxicação do mesmo pelo grupamento *heme* e levando a acumulação tóxica no interior da célula do *Plasmodium*.

Como fármaco de tratamento não é utilizada de forma isolada para o combate da malária, com o objetivo de dificultar o surgimento de resistência do parasita a classe dos aril amino-álcool (OMS, 2015).

Figura 15 - Fórmula estrutural da lumefantrina.



Fonte: (Do autor, 2016).

A lumefantrina é uma substância altamente lipofílica, absorvida rapidamente pelo trato gastro intestinal quando administrada concomitantemente com alimentos gordurosos e leite. Porém, a característica de absorção desta substância pelo organismo humano promove uma enorme variação na biodisponibilidade do fármaco, uma vez que outros parâmetros também precisariam ser levados em consideração para que se possa explicar a farmacocinética da lumefantrina, o que atualmente não é bem elucidado.

Apresenta alta taxa de ligação com proteínas plasmáticas, (cerca de 99,7%) e tempo de meia vida de eliminação de aproximadamente três dias. É extensamente metabolizada pelo fígado através da enzima CYP3A4 para o metabólito desbutil-lumefantrina, responsável pela ação antiparasitária (MWEBAZA, 2016).

A tabela 5 resume os parâmetros farmacocinéticos da lumefantrina em estudos onde a dose recomendada da substância para tratamento profilático é utilizada.

Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos da lumefantrina.

Parâmetro	Valor
$C_{max}$ (ng/mL)	4456 – 28300
$T_{max}$ (h)	2,0 – 66,3
AUC <sub>0-infinito</sub> (µg.h/mL)	207 – 2730
Eliminação $T_{1/2}$ (h)	32,7 – 275,0
Cl/f (L/h per kg)	0,077 – 0,104
Vd/f (L/kg)	0,4 – 8,9

Fonte: (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

## 1.6 Identificação e diagnóstico da malária no Brasil

Atualmente no nosso país, a identificação da malária é realizada por consulta médica, normalmente ocasionada após a manifestação de alguns dos muitos sintomas conhecidos da malária, como por exemplo: febre, diarreia, vômito, palidez, falta de ar e taquicardia (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2015).

É importante que exista uma associação de critérios clínicos e epidemiológicos para que pacientes possivelmente infectados que apresentem sintomas clínicos da malária em regiões endêmicas, sejam submetidos a exames laboratoriais para a confirmação do diagnóstico médico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Esses exames confirmatórios podem ser realizados através de testes rápidos para maior agilidade do diagnóstico, necessitando de pouca ou nenhuma experiência de manuseio dos kits por pessoas qualificadas ou leigas, além de possuir baixo custo de operação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) ou por análise laboratoriais de sangue total por microscopia, tradicionalmente por gota espessa ou esfregaço delgado, necessitando de material, reagentes e infraestrutura adequados, bem como de mão de obra técnica capacitada para sua realização, objetivando a detecção e diferenciação das espécies de plasmódios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Uma vez confirmado o diagnóstico da doença e o tipo de *Plasmodium* sp. que originou a infecção, é iniciado o tratamento através de esquemas utilizando fármacos derivados da artemisinina para o combate do parasita em questão (MANUAL DE TERAPÊUTICA DA MALÁRIA, 2001).

Porém, após o diagnóstico da malária e o início do tratamento, não há um acompanhamento para que se avalie a adesão e a qualidade do tratamento oferecido pelo SUS, uma vez que apenas o diagnóstico interpessoal é realizado através de questionários verbais onde o paciente é questionado sobre a adesão do tratamento.

Sendo a malária ainda considerada uma doença negligenciada e que possui um grande número de casos confirmados a cada ano, fica evidente a importância de desenvolver metodologias para o doseamento desses fármacos na corrente sanguínea para avaliação do tratamento. Esta avaliação pode ser realizada através do monitoramento da biodisponibilidade dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da malária através de suas concentrações plasmáticas.

Entretanto, isso não é um trabalho simples, pois normalmente as áreas endêmicas e de tratamento são lugares de difícil acesso, muitas vezes sem infraestrutura adequada para o desenvolvimento do trabalho, na sua parte clínica e analítica. Pode-se citar como a ausência de infraestrutura a não disponibilidade de instalações para armazenamento das amostras de sangue coletadas, como ultrafreezers por exemplo. Além disso, não há nessas regiões endêmicas centros analíticos que possuam equipamentos com tecnologia de ponta, calibrados e certificados para análises quantitativas e qualitativas do sangue de pacientes além de profissionais habilitados para a execução dos procedimentos de extração e purificação das amostras coletadas, segundo as normas brasileiras de vigilância sanitária vigentes.

Visando uma maneira de contornar as diversas dificuldades encontradas, Hellgren et al (1990), realizaram um estudo *in vitro* no qual compararam métodos de coleta de sangue de voluntários contendo quinina em papel filtro e também por agulha capilar, e propuseram estas técnicas de coleta como forma de auxiliar o monitoramento do tratamento da malária em pacientes residentes em comunidades de difícil acesso, através de métodos de detecção cromatográficas de maneira remota.

Os resultados não demonstraram diferenças entre as técnicas, provando que a técnica em papel pode ser uma ferramenta importante para que sejam feitos ensaios de pesquisa clínica em áreas endêmicas.

Entretanto, é importante ressaltar que o trabalho realizado por HELLGREN et al (1990), contendo amostras adsorvidas em papel filtro, foi realizado apenas em voluntários sadios após administração do fármaco quinina e que a metodologia empregada de coleta de material biológico e adsorção em papel filtro não foi bem padronizada e elucidada.

Dessa forma o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma ferramenta auxiliar para o combate desta doença há tantos anos presente no território nacional, através de uma coleta de material biológico realizada em áreas remotas, seu armazenamento e posterior envio para o centro de análise. Assim, a eficácia do tratamento oferecido pelos programas de saúde poderia ser avaliada através de dados clínicos, bem como sua adesão, uma das partes essenciais da atual estratégia de combate da doença e objeto principal do trabalho.

Nesse cenário é importante desenvolver processos capazes de avaliar alguns dos principais fármacos atualmente empregados nos esquemas de tratamento da malária, cloroquina, primaquina, lumefantrina e mefloquina, objetivando a extração e purificação desse material adsorvido em papel filtro, seguido da quantificação simultânea dos fármacos para uma posterior avaliação efetiva do tratamento, bem como a adesão do paciente.

Uma metodologia disponibilizada no Brasil, contendo a capacidade de monitorar de forma simultânea os principais fármacos disponibilizados para o tratamento contra a malária pelo Sistema Único de Saúde (SUS), seria capaz de atender a uma demanda sanitária no nosso país. Esta metodologia pode ser uma ferramenta de avaliação para monitorar o tratamento da malária a fim de que se possa controlar de maneira eficiente o número de infectados e dificultar, cada vez mais, a resistência de *Plasmodium* sp. aos fármacos. Com a redução de infectados, o agente causador ficaria menos tempo ativo, tendo menos tempo para sofrer mutações e alterações genéticas que viabilizem a sua evolução e consequentemente o desenvolvimento de resistência aos fármacos.

## 1.7 Métodos mais utilizados na análise de substâncias em matriz biológica

### 1.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os compostos presentes em uma mistura são aplicados sobre uma coluna analítica denominada de fase estacionária (usualmente contida em um cilindro de aço, distribuído de forma homogênea e empacotada, composta de substâncias químicas contendo estruturas de carbono (C4, C8, C18) ou grupamentos químicos a base de partículas de sílica microporosa com grande pureza e formato esférico, com dois filtros de entrada e saída (*frit*). A amostra é percolada em associação com os solventes de arraste, denominada fase móvel ou fase de arraste. A separação dos compostos ocorre em função das suas diferenças de afinidade química na interação entre a fase estacionária e a fase móvel, deslocando-se, portanto, segundo sua força de arraste através da coluna em diferentes velocidades (COLLINS, 2006).

Teve sua origem em 1906 onde o botânico Mikhael Semenovitch Tswett, apresentou dois trabalhos onde extratos de folhas foram separados através de uma coluna de vidro contendo leitos de carbonato de cálcio finamente divididos de maneira homogênea, que foram submetidos ao arraste através da adição de éter de petróleo pelo tubo de vidro juntamente com o extrato vegetal (COLLINS, 2009). As espécies separadas (clorofilas e xantofilas) apareciam nos leitos como bandas coloridas, e por isso Tswett chamou o método de cromatografia, do grego *chroma* (cor) e *graphein* (escrever) (SKOOG e LEARY, 1992).

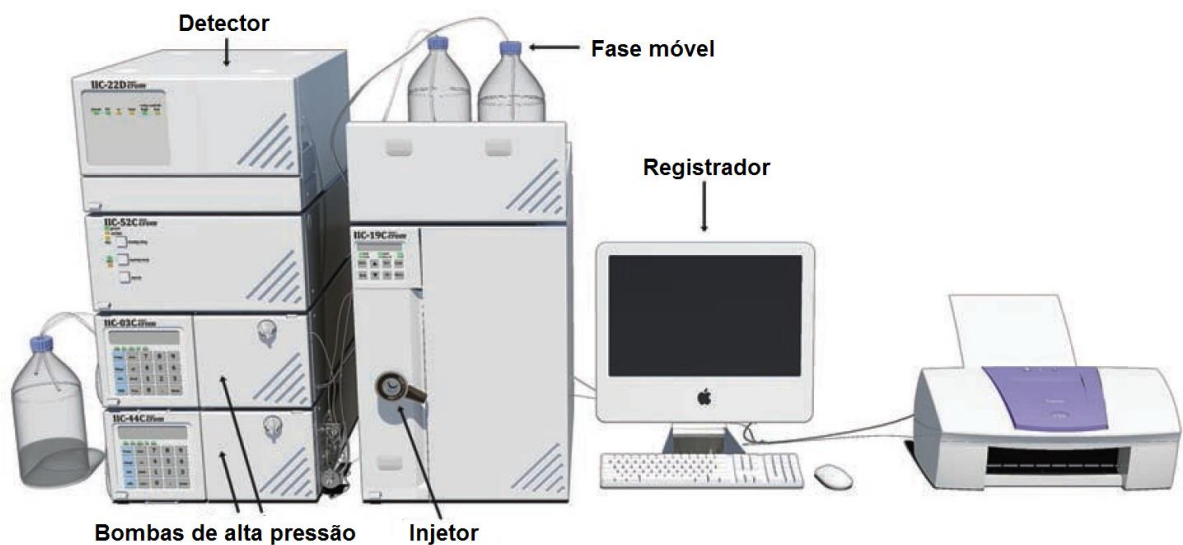
Entre os modernos métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar diferenciado devido a versatilidade e facilidade de identificação, separação e quantificação de substâncias químicas através da combinação desta técnica com a espectrofotometria e a espectrometria de massas.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 16) é utilizado um sistema de bombeamento de solventes sob alta pressão de forma que a fase móvel, composta por uma mistura de solventes, consiga transportar a amostra através da coluna cromatográfica (composta pela fase estacionária). Essas partículas possuem permeabilidade ao solvente (fase móvel), e a área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama (HARRIS, 2008).

A fase móvel deve ser compatível com o tipo de fase estacionária utilizada, assim como o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes e aditivos utilizados para a realização das análises por cromatografia, os mais utilizados, usualmente são: água, metanol, acetonitrila, ácido fórmico e acetato de amônio (COLLINS, 2006).

A coluna cromatográfica normalmente é constituída de um material inerte (normalmente aço inoxidável) que resiste a pressão e a temperatura do sistema de cromatografia. As colunas mais utilizadas contêm octadecilsilano (C18, RP18, ODS), octilsilano (C8, RP8), cianopropil (CN) e amina (NH<sub>2</sub>), como constituintes da fase estacionária (MALDANER et al, 2010).

Figura 16 - Diagrama ilustrativo dos principais componentes de um cromatógrafo líquido moderno.



Fonte: (LANÇAS, 2009).

Em relação aos detectores utilizados em um cromatógrafo, não existe um que apresente todas as propriedades necessárias para que ele seja considerado ideal para a análise. Não são versáteis, ou universais, porém existem detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. A sensibilidade de um detector é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. (SKOOG e LEARY, 1992).

Os detectores mais usados na cromatografia líquida por alta eficiência são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta e no visível; os detectores de

fluorescência, utilizados como método de detecção específica sendo sensíveis apenas para substâncias que fluorescem; os detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna, contendo os componentes da amostra, e a detecção por espectrometria de massas acoplada ao sistema de cromatografia líquida, técnica de detecção extremamente sensível e altamente seletiva (BRAITHWAITE e SMITH, 1996).

### 1.7.2 Espectrometria de massas (EM)

Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS) é uma técnica analítica física em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons, onde são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa ( $m$ ) sobre a carga ( $z$ ),  $m/z$ . Sendo assim, qualquer material que possa ser ionizado e cujos íons possam ser transferidos para a fase gasosa são capazes de ser analisados por espectrometria de massas (WILSON e WALKER, 2010).

Todos os espectrômetros de massa são basicamente similares. Eles são constituídos por um sistema de alto vácuo através da utilização de bombas turbomoleculares; um sistema de entrada de amostras; uma fonte de ionização, onde as amostras são desolvatadas, convertidas em íons e transferidos para a fase gasosa; um analisador de massas, podendo através de quadrupolos, quadrupolos-ion trap, tempo de voo; e um detector (WILSON e WALKER, 2010).

Um detector de massas normalmente separa os íons pelo uso de campos magnéticos ou elétricos. Alternativamente o tempo que os íons de diferentes massas levam para migrar distâncias definidas pode ser medido precisamente em um detector de massas por tempo de voo (TOF, *time-of-flight*).

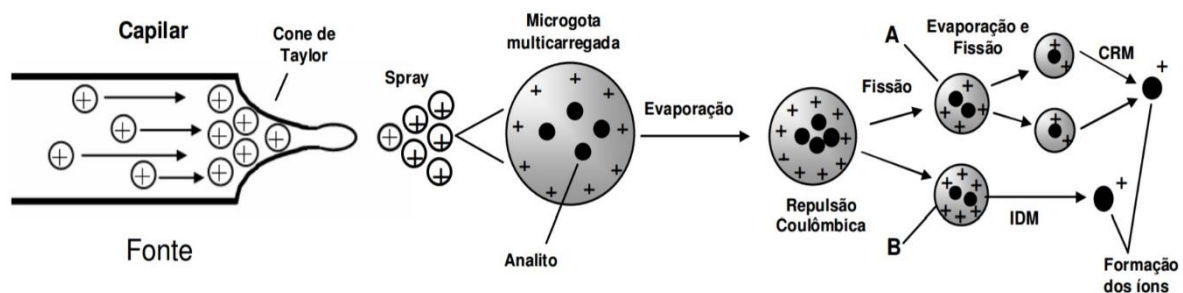
O desenvolvimento de técnicas de ionização por electrospray (*electrospray ionization*, ESI); ionização química por pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI); ionização por fótons à pressão atmosférica (*atmospheric pressure photon ionization*, APPI); ionização/dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI,); tornou possível a determinação precisa de massas de compostos de uma larga faixa de pesos moleculares, normalmente entre 50 e 3000 *dalton* (Da), permitindo a aplicabilidade da espectrometria de massas para quase todas as moléculas biológicas. Dentre as

técnicas mencionadas, a mais utilizada é a técnica de ionização por *electrospray*. (MORAES E LAGO, 2003).

A amostra é dissolvida em um solvente (fase móvel), usualmente não polar, e bombeada por alta pressão para a *probe*, onde é introduzida em um tubo capilar composto por aço inox (eletrodo), ao qual é aplicada uma voltagem elevada, normalmente entre 3.000 e 5.000 volts (V). Conseqüentemente a esse fenômeno, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (dessolvatação) e a medida que essas gotículas de solvente evaporam (usualmente com auxílio de aquecimento da fonte de íons para facilitar o processo), sua carga permanece inalterada. Como sua a tensão superficial é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da voltagem imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores, denominada “Explosão Coulômbica”. Este processo continua de maneira sucessiva até que apenas os íons do analito, agora transferido para uma “fase gasosa”, são transferidos para o cone de amostragem e conseqüentemente para o espectrômetro de massas induzido pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (WILSON e WALKER, 2010).

O princípio básico de uma interface para CLAE utilizando a ionização via ESI é apresentado na figura 17.

Figura 17 - Modelo de ionização através de *electrospray*



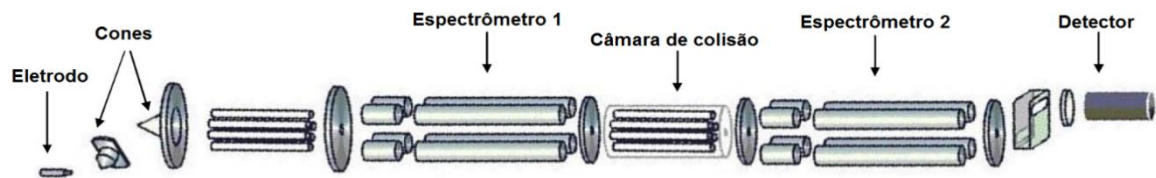
Nota: Na rota proposta (A), observamos a provável dessolvatação de moléculas hidrofílicas (Charged-Residue Model, CRM). Na rota proposta (B), observamos a provável dessolvatação de moléculas hidrofóbicas (Ion-Desorption Model, IDM),  
 Fonte: (SOUZA, 2008).

Atualmente, a espectrometria de massa é amplamente utilizada em equipamentos que possibilitam o acoplamento em modo sequencial (ou *tandem*), também conhecida como EM/EM ou EM<sup>2</sup>, cujo funcionamento é possibilitado por um



sistema em que dois espectrômetros de massas são utilizados em sequência, separados por uma câmara de colisão (Figura 18).

Figura 18 - Esquema representando dois espectrômetros de massas acoplados em modo sequencial, separados por uma câmara de colisão.



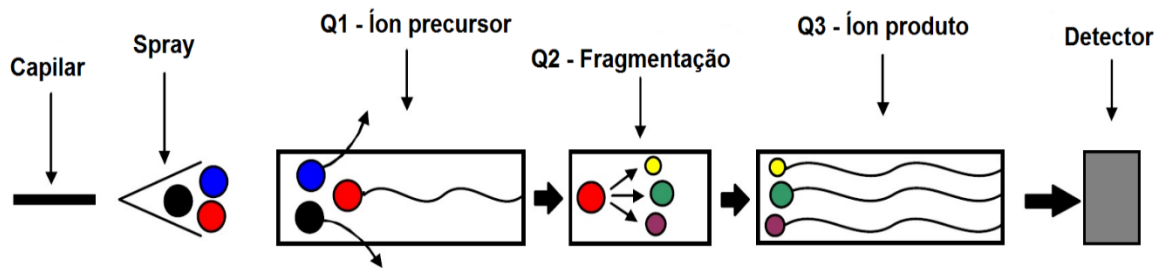
Fonte: (SOUZA, 2008).

Esse tipo de análise realiza o monitoramento de íons provenientes de uma amostra através de um fragmento confirmatório originado do íon de interesse (Figura 19). A técnica de fragmentação, é um processo físico denominado de dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation*, CID) também conhecida como dissociação ativada por colisão (*Collisionally Activated Dissociation*, CAD), que ocorre em um sistema de quadrupolos por três etapas distintas (SKOOG e LEARY, 1992).

A primeira parte do procedimento de detecção compreende a seleção de um íon, chamado de precursor, normalmente a substância de interesse de um trabalho, contendo uma carga (que pode ser positiva ou negativa), pelo primeiro espectrômetro de massas, usualmente chamado de primeiro quadrupolo ou Q1.

O segundo estágio consiste da dissociação induzida por colisão (DIC) deste íon precursor com o objetivo da obtenção de íons-fragmentos (ou íons produto) em um compartimento chamado de câmara de colisão ou Q2. Este processo de fragmentação ocorre através de um fenômeno no qual os íons adquirem energia interna através da colisão com uma molécula neutra. Para tal fim é utilizado um gás inerte para favorecer a fragmentação desses íons, sendo nitrogênio e argônio os mais utilizados (SOUZA, 2008).

Figura 19 - Diagrama da dissociação induzida por colisão.



Nota: O íon precursor monitorado no primeiro quadrupolo (Q1) é fragmentado na câmara de fragmentação (Q2) e produz íons produtos, onde são monitorados pelo segundo quadrupolo (Q3).  
 Fonte: (SOUZA, 2008).

No terceiro estágio é realizada a detecção e monitoramento dos íons produtos obtidos na dissociação pelo segundo espectrômetro de massas, também chamado de Q3 (SOUZA, 2008).

Esta é uma técnica de detecção altamente sensível e específica, sendo amplamente utilizada em diversas áreas do conhecimento como análise de traços de substâncias, controle de dopagem, produtos naturais, poluentes, drogas, toxicologia, forense, fluidos biológicos, dentre muitas outras (CROTTI, 2006).

Para o presente trabalho foi utilizada esta técnica de detecção, uma vez que a mesma possibilitou o monitoramento simultâneo das quatro substâncias de interesse, assim como seu padrão interno, em uma única metodologia de extração e detecção, de maneira seletiva e específica, com suas análises sendo realizadas de maneira rápida e com a obtenção de resultados confiáveis, robustos e precisos, disponibilizando assim, uma metodologia analítica capaz de auxiliar o tratamento da malária em pacientes residentes em todo o território nacional.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver, validar e utilizar método bioanalítico na análise de quatro antimaláricos (cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina) empregados no Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde para a verificação da adesão ao tratamento da malária.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1. Desenvolver método bioanalítico para a análise simultânea de quatro antimaláricos em sangue total, adsorvido em papel filtro, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial;

2.2.2. Validar o método bioanalítico para a análise simultânea dos quatro antimaláricos objetos do estudo, conforme resolução RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 (ANVISA);

2.2.3. Analisar as amostras dos pacientes do estudo em tratamento contra a malária quanto aos parâmetros de farmacocinética e biodisponibilidade, segundo o cronograma estabelecido pelo protocolo do estudo;

2.2.4. Avaliar os resultados bioanalíticos referentes às amostras dos indivíduos do estudo em tratamento contra a malária para a verificação da adesão ao tratamento.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

##### 3.1.1 Padronização do papel filtro e coleta das amostras

O procedimento para a coleta de sangue total dos pacientes participantes da pesquisa foi realizado por punção venosa, em tubo de coleta heparinizado.

Uma quantidade fixa de matriz biológica (100 µL) foi transferida para um microtubo de polipropileno com capacidade de 2 mL (Axygen, Safe-Lock, 12 X 42 mm, 2 mL) e adsorvida com o auxílio de uma pipeta automática (Gilson, P100) para uma superfície de papel filtro previamente dobrada e padronizada (GE Healthcare Life Sciences, Grade 31 ET CHR, 20 X 50 mm).

O microtubo foi armazenado em temperatura ambiente, para posterior transporte para a central bioanalítica.

##### 3.1.2 Preparo das soluções de uso geral

Diversas soluções com diferentes reagentes e solventes, utilizando várias proporções e concentrações foram testadas, no entanto, as soluções descritas neste item foram aquelas que corresponderam às melhores condições encontradas para o método bioanalítico.

Todas as soluções utilizadas na pesquisa foram preparadas individualmente, utilizando reagentes analíticos certificados, balança analítica (Gehaka, AG 200) de precisão 0,0001 g e vidrarias calibradas.

Todo o processo de preparo de soluções foi registrado em formulários físicos e eletrônicos, assim como em log-books do laboratório bioanalítico a fim de se garantir sua rastreabilidade e a segurança dos dados.

##### 3.1.2.1 Preparo de solução de acetato de amônio 2 mol/L

Foram pesados 15,8275 g de acetato de amônio (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV) em balança analítica de precisão 0,0001g (Gehaka, AG 200) e a massa de reagente pesada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. A esta

massa foi adicionada uma quantidade q.s. de água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10) seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do reagente, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com água ultrapurificada, originando uma solução de acetato de amônio com concentração equivalente a 2 mol/L. Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

### *3.1.2.2 Preparo de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L*

Foram pesados 4,0692 g de hidróxido de sódio (J.T.Baker, 98,3%, P.A. ACS) em balança analítica de precisão 0,0001g (Gehaka, AG 200) e a massa de reagente pesada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. A esta massa foi adicionada uma quantidade q.s. de água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vortex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do reagente, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com água ultrapurificada, originando uma solução de hidróxido de sódio com concentração equivalente a 1 mol/L. Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

### *3.1.2.3 Preparo da fase móvel aquosa - Solução aquosa contendo acetato de amônio 40 mmol/L e ácido fórmico q.s. para ajuste de pH a 3,50*

Foram adicionados aproximadamente, 500 mL de água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10) a um balão volumétrico de 1000 mL, previamente rotulado. Em seguida, adicionou-se 20 mL de solução de acetato de amônio 2 mol/L e quantidade q.s. de água ultrapurificada até próximo ao menisco de referência. Após este procedimento, a solução foi agitada para completa homogeneização. O pH da solução foi medido com o auxílio de um pHmetro (Digimed, DM-22) e foi adicionada uma quantidade suficiente de ácido fórmico (Scharlau, 96% P.A. ACS) a esta solução para que fosse obtido o pH de 3,50. Completou-se o volume do balão até a marca de referência com água ultrapurificada. Em seguida a solução foi transferida para um frasco devidamente rotulado. Ao final do procedimento, a solução foi degaseificada por 5 min em banho

ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.4 Preparo da fase móvel orgânica - Metanol/acetonitrila (80:20, v/v)*

Foram adicionados 800 mL de metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV) a uma proveta volumétrica de 1000 mL previamente rotulada. O solvente foi transferido para um frasco devidamente rotulado. Em seguida, foi medida em outra proveta de 1000 mL previamente rotulada uma quantidade de 200 mL de acetonitrila (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV). Em seguida, o solvente foi transferido para o frasco onde se encontrava o metanol previamente medido. Após este procedimento, a solução foi agitada para completa homogeneização e degaseificada por 5 min em banho ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.5 Preparo da solução de lavagem do sistema de cromatografia - Metanol*

Foram transferidos 1000 mL de metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV) para um frasco devidamente rotulado. Ao final do procedimento, a solução foi degaseificada por 5 min em banho ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.6 Preparo da solução de diluição das soluções estoque dos analitos cloroquina, mefloquina e primaquina, do padrão interno carbamazepina, das substâncias interferentes nicotina e cafeína, de diluição das amostras e das soluções de trabalho de uso diário dos analitos e substâncias do estudo - Metanol/água ultrapurificada (80:20, v/v)*

Foram adicionados 400 mL de metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV) a uma proveta volumétrica de 500 mL previamente rotulada. O solvente foi transferido para um frasco devidamente rotulado. Em seguida, foram medidos em proveta volumétrica de 500 mL previamente rotulada uma quantidade de 100 mL de água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10). Após a ação, o solvente foi transferido para o frasco onde se encontrava o metanol previamente medido. Ao

final do procedimento, a solução foi degaseificada por 5 min em banho ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.7 Preparo da solução de diluição da solução estoque do analito lumefantrina - Metanol/água ultrapurificada (80:20, v/v) + ácido fórmico 0,1%*

Foram adicionados 40 mL de metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV) a uma proveta volumétrica de 100 mL previamente rotulada. O solvente foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL devidamente identificado. Foi adicionado com o auxílio de uma pipeta automática (Gilson, P200), 104 µL de ácido fórmico (Scharlau, 96,0 %, P.A. ACS). Em seguida, foram medidos em proveta volumétrica de 100 mL previamente rotulada uma quantidade de 10 mL de água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10). Após a ação, o solvente foi transferido para o frasco onde se encontrava o metanol contendo ácido fórmico previamente medido. Ao final do procedimento, a solução foi degaseificada por 5 min em banho ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.8 Preparo da solução de extração - Éter metil terc-butilico*

Foram adicionados 200 mL de éter metil *terc*-butilico (Tedia 99,8% grau HPLC/UV) a uma proveta volumétrica de 500 mL previamente identificada. O solvente foi transferido para um frasco devidamente etiquetado. Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

#### *3.1.2.9 Preparo da solução de diluição da amostra - Metanol/acetonitrila (80:20, v/v)/ solução aquosa contendo acetato de amônio 40 mmol/L e ácido fórmico q.s. para ajuste de pH a 3,50 (v/v) - (75:25, v/v)*

Adicionou-se 150 mL de fase móvel orgânica, previamente preparada conforme seção 3.1.2.4, a uma proveta volumétrica de 250 mL previamente identificada. O solvente foi transferido para um frasco devidamente etiquetado. Em seguida, foram medidos em proveta volumétrica de 250 mL, previamente rotulada,

uma quantidade de 50 mL de solução de fase móvel aquosa, previamente preparada como descrito na seção 3.1.2.3. Após a ação, a fase móvel aquosa medida foi transferida para o frasco onde se encontrava a solução da fase móvel orgânica previamente transferida. Após este procedimento, a solução foi agitada para completa homogeneização e degaseificada por 5 min em banho ultrassônico (Unique, USC2800-A). Todo o preparo foi realizado em capela de exaustão (Alba Jonhson, AT100).

### 3.1.3 Preparo das soluções estoque dos analitos cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina

As soluções estoque dos analitos foram preparadas individualmente, pesando-se os padrões analíticos certificados em balança analítica (Shimadzu, AUW220D) de precisão 0,00001 g e com a utilização de vidrarias calibradas.

Todo o processo de preparo de soluções foi registrado em formulários físicos e eletrônicos, assim como em log-books do laboratório bioanalítico a fim de se garantir sua rastreabilidade e a segurança dos dados.

#### 3.1.3.1 Solução padrão estoque de cloroquina 1 mg/mL

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 8,09 mg de difosfato de cloroquina (USP, teor 99,7%), correspondente a 5,00 mg de cloroquina base livre e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), previamente preparada conforme seção 3.1.2.6, seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de cloroquina.



### *3.1.3.2 Solução padrão estoque de primaquina 1 mg/mL*

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 8,69 mg de difosfato de primaquina (INCQS, teor 99,7%), correspondente a 5,00 mg de primaquina base livre, e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), previamente preparada como descrita na seção 3.1.2.6, seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vortex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de primaquina.

### *3.1.3.3 Solução padrão estoque de mefloquina 1 mg/mL*

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 5,62 mg de cloridrato de mefloquina (USP, teor 97,6%), correspondente a 5,00 mg de mefloquina base livre, e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), previamente preparada como descrita na seção 3.1.2.6, seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vortex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de mefloquina.

### *3.1.3.4 Solução padrão estoque de lumefantrina 1 mg/mL*

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 5,01 mg de lumefantrina (USP, teor 99,9%), e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9%

grau HPLC/UV) / água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10) contendo 0,1 % de ácido fórmico (Scharlau, 96,0%, P.A. ACS) (80:20, v/v), previamente preparada conforme seção 3.1.2.7, seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de lumefantrina.

#### 3.1.4 Preparo das soluções de trabalho de uso diário dos analitos cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina

As soluções de trabalho de uso diário referentes aos analitos da pesquisa foram preparadas a partir de sucessivas diluições da solução estoque e das chamadas soluções intermediárias, cuja utilização se dá apenas para o preparo das soluções correspondentes à curva de calibração, não participando assim da linearidade definida para o método bioanalítico. As soluções intermediárias foram preparadas individualmente para cada analito e cada concentração. As soluções de uso diário (soluções de trabalho) referentes aos padrões de calibração e aos controles de qualidade foram preparadas de maneira simultânea para os quatro fármacos em análise no presente trabalho.

##### 3.1.4.1 Preparo das soluções de trabalho de uso diário da cloroquina

A solução estoque de cloroquina preparada segundo seção 3.1.3.1 foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 nas proporções de 1/10, 1/100 e 1/1000, em balões volumétricos calibrados de capacidades de 10 mL, 10 mL e 25 mL respectivamente, originando três soluções intermediárias com concentrações de 100000 ng/mL, 10000 ng/mL e 1000 ng/mL, respectivamente (STB12, STB11 e STB10).

A solução intermediária com concentração de 100000 ng/mL (STB12) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando três soluções de concentrações 1600 ng/mL, 1000 ng/mL e 800 ng/mL (STB09, STB08 e STB07), respectivamente. Além de serem utilizadas no preparo da linearidade, estas

soluções também corresponderam aos controles de qualidade de diluição (CQD), limite superior de quantificação (LSQ) e ao controle de qualidade de alta concentração (CQA).

A solução intermediária com concentração de 10000 ng/mL (STB11) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando quatro soluções de concentrações 400 ng/mL, 200 ng/mL, 100 ng/mL e 50 ng/mL. (STB06, STB05, STB04 e STB03), respectivamente. Além de serem utilizadas no preparo da linearidade, as soluções STB06 e STB04 também corresponderam ao controle de qualidade de média concentração (CQM) e ao controle de qualidade de concentração intermediária (CQC), respectivamente.

A solução intermediária com concentração de 1000 ng/mL (STB10) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando duas soluções de concentrações 20 ng/mL e 10 ng/mL (STB02 e STB01), respectivamente. Além de serem utilizadas no preparo da linearidade, estas soluções também corresponderam ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e ao limite inferior de quantificação (LIQ). A tabela 6 descreve o preparo das soluções de trabalho da cloroquina.

Tabela 6 - Preparo das soluções de trabalho de uso diário da cloroquina.

Solução de trabalho	Nível de calibração	Controle de qualidade	Concentração da solução (ng/mL)	Volume pipetado (ng/mL)	Volume do diluente (mL)	Volume final preparado (mL)	Solução utilizada
SME	----	----	1000000,00	----	----	5	Padrão
STB12	----	----	100000,00	1,000	9,000	10	SME
STB11	----	----	10000,00	0,100	9,900	10	SME
STB10	----	----	1000,00	0,025	24,975	25	SME
STB09	----	CQD	1600,00	0,800	49,200	50	STB12
STB08	08	----	1000,00	0,500	49,500	50	STB12
STB07	07	CQA	800,00	0,400	49,600	50	STB12
STB06	06	CQM	400,00	2,000	48,000	50	STB11
STB05	05	----	200,00	1,000	49,000	50	STB11
STB04	04	CQC	100,00	0,500	49,500	50	STB11
STB03	03	----	50,00	0,250	49,750	50	STB11
STB02	02	CQB	20,00	1,000	49,000	50	STB10
STB01	01	LIQ	10,00	0,500	49,500	50	STB10

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 3.1.4.2 Preparo das soluções de trabalho de uso diário da primaquina

A solução estoque da primaquina preparada segundo a seção 3.1.3.2 foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 nas proporções de 1/10, 1/100 e 1/1000 em balões volumétricos calibrados de capacidades de 10 mL, 10 mL e 25 mL respectivamente, originando três soluções intermediárias com concentrações de 100000 ng/mL, 10000 ng/mL e 1000 ng/mL, respectivamente (STB 12, STB 11 e STB 10).

A solução intermediária com concentração de 100000 ng/mL (STB12) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando três soluções de concentrações 1600 ng/mL, 1000 ng/mL e 800 ng/mL (STB09, STB08 e STB07), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, estas soluções também corresponderam aos controles de qualidade CQD, LSQ e CQA, respectivamente.

A solução intermediária com concentração de 10000 ng/mL (STB11) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando duas soluções de concentrações 400 ng/mL e 200 ng/mL (STB06 e STB05), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, a solução de trabalho STB06 também correspondeu ao controle de qualidade CQM.

A solução intermediária com concentração de 1000 ng/mL (STB10) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6 em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando quatro soluções de concentrações 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL e 2 ng/mL (STB04, STB03, STB02 e STB01), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, as soluções de trabalho 04, 02 e 01 também corresponderam aos controles de qualidade CQC, CQB e LIQ, respectivamente. A tabela 7 descreve o preparo das soluções de trabalho da primaquina.

Tabela 7 - Preparo das soluções de trabalho de uso diário da primaquina.

Solução de trabalho	Nível de calibração	Controle de qualidade	Concentração da solução (ng/mL)	Volume pipetado (ng/mL)	Volume do diluente (mL)	Volume final preparado (mL)	Solução utilizada
SME	----	----	1000000	----	----	5	Padrão
STB12	----	----	100000	1,000	9,000	10	SME
STB11	----	----	10000	1,000	9,000	10	STB12
STB10	----	----	1000	1,000	24,000	25	STB11
STB09	----	CQD	1600	0,800	49,200	50	STB12
STB08	08	----	1000	0,500	49,500	50	STB12
STB07	07	CQA	800	0,400	49,600	50	STB12
STB06	06	CQM	400	2,000	48,000	50	STB11
STB05	05	----	200	1,000	49,000	50	STB11
STB04	04	CQC	20	1,000	49,000	50	STB10
STB03	03	----	10	0,500	49,500	50	STB10
STB02	02	CQB	5	0,250	49,750	50	STB10
STB01	01	LIQ	2	0,100	49,900	50	STB10

Fonte: (Do autor, 2016).

### 3.1.4.3 Preparo das soluções de trabalho de uso diário da mefloquina

A solução estoque de mefloquina preparada segundo a seção 3.1.3.3. foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. nas proporções de 1/10 e 1/100 em balões volumétricos calibrados de capacidade de 10 mL cada, originando duas soluções intermediárias com concentrações de 100000 ng/mL e 10000 ng/mL, respectivamente (STB11 e STB10).

A solução estoque com concentração de 1000000 ng/mL (SME) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando duas soluções de concentrações 8000 ng/mL e 5000 ng/mL. (STB 09 e STB 08), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, estas soluções também corresponderam aos controles de qualidade CQD e ao LSQ, respectivamente.

A solução intermediária com concentração de 100000 ng/mL (STB11) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando três soluções de concentrações 4000 ng/mL, 2000 ng/mL e 1000 ng/mL (STB07, STB06 e STB05),

respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, as soluções de trabalho 07 e 06 também corresponderam aos controles de qualidade CQA e ao CQM, respectivamente.

A solução intermediária com concentração de 10000 ng/mL (STB10) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando quatro soluções de concentrações 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL e 20 ng/mL. (STB04, STB03, STB02 e STB01), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, as soluções de trabalho STB04, STB02 e STB01 também corresponderam aos controles de qualidade CQC, CQB e LIQ, respectivamente. A tabela 8 descreve o preparo das soluções de trabalho da mefloquina.

Tabela 8 - Preparo das soluções de trabalho de uso diário da mefloquina.

Solução de trabalho	Nível de calibração	Controle de qualidade	Concentração da solução (ng/mL)	Volume pipetado (ng/mL)	Volume do diluente (mL)	Volume final preparado (mL)	Solução utilizada
SME	----	----	1000000	----	----	5	Padrão
STB11	----	----	100000	1,000	9,000	10	SME
STB10	----	----	10000	1,000	9,000	10	STB11
STB09	----	CQD	8000	0,400	49,600	50	SME
STB08	08	----	5000	0,250	49,750	50	SME
STB07	07	CQA	4000	2,000	48,000	50	STB11
STB06	06	CQM	2000	1,000	49,000	50	STB11
STB05	05	----	1000	0,500	49,500	50	STB11
STB04	04	CQC	200	1,000	49,000	50	STB10
STB03	03	----	100	0,500	49,500	50	STB10
STB02	02	CQB	50	0,250	49,750	50	STB10
STB01	01	LIQ	20	0,100	49,900	50	STB10

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 3.1.4.4 Preparo das soluções de trabalho de uso diário da lumefantrina

A solução estoque de lumefantrina preparada segundo a seção 3.1.3.4. foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. nas proporções de 1/10, 1/100 e 1/1000 em balões volumétricos calibrados com capacidade de 10 mL, 10 mL e 25 mL respectivamente, originando três soluções intermediárias com

concentrações de 100000 ng/mL, 10000 ng/mL e 1000 ng/mL, respectivamente (STB12, STB11 e STB10).

A solução intermediária com concentração de 100000 ng/mL (STB12) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando três soluções de concentrações 1600 ng/mL, 1000 ng/mL e 800 ng/mL (STB09, STB08 e STB07), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, estas soluções também corresponderam aos controles de qualidade CQD, LSQ e ao CQA, respectivamente.

A solução intermediária com concentração de 10000 ng/mL (STB11) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando duas soluções de concentrações 400 ng/mL e 200 ng/mL. (STB06 e STB05), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, a solução de trabalho STB06 também correspondeu ao controle de qualidade CQM.

A solução intermediária com concentração de 1000 ng/mL (STB10) foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balões volumétricos calibrados distintos de 50 mL cada, originando quatro soluções de concentrações 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL e 2 ng/mL (STB04, STB03, STB02 e STB01), respectivamente. Além de serem usadas no preparo da linearidade, as soluções de trabalho STB04, STB02 e STB01 também corresponderam aos controles de qualidade CQC, CQB e LIQ, respectivamente. A tabela 9 descreve o preparo das soluções de trabalho da lumefantrina.

Tabela 9 - Preparo das soluções de trabalho de uso diário da lumefantrina.

Solução de trabalho	Nível de calibração	Controle de qualidade	Concentração da solução (ng/mL)	Volume pipetado (ng/mL)	Volume do diluente (mL)	Volume final preparado (mL)	Solução utilizada
SME	----	----	1000000	----	----	5	Padrão
STB12	----	----	100000	1,000	9,000	10	SME
STB11	----	----	10000	1,000	9,000	10	STB12
STB10	----	----	1000	1,000	24,000	25	STB11
STB09	----	CQD	1600	0,800	49,200	50	STB12
STB08	08	----	1000	0,500	49,500	50	STB12
STB07	07	CQA	800	0,400	49,600	50	STB12
STB06	06	CQM	400	2,000	48,000	50	STB11
STB05	05	----	200	1,000	49,000	50	STB11
STB04	04	CQC	20	1,000	49,000	50	STB10
STB03	03	----	10	0,500	49,500	50	STB10
STB02	02	CQB	5	0,250	49,750	50	STB10
STB01	01	LIQ	2	0,100	49,900	50	STB10

Fonte: (Do autor, 2016).

O preparo das soluções de trabalho foi descrito de maneira individual, porém, uma vez que a proposta do método bioanalítico é analisar de maneira simultânea os quatro analitos do estudo, as soluções de trabalho referentes à curva de calibração foram preparadas de maneira simultânea. Sendo assim, as soluções de trabalho referentes a STB01 até a STB08 (linearidade) e ao CQD (STB09) apresentaram as concentrações para os analitos, como ilustradas na tabela 10.

Tabela 10 - Concentração das soluções de trabalho de uso diário dos analitos do estudo.

Solução de trabalho	Nível de calibração	Controle de qualidade	Concentração em matriz biológica (ng/mL)			
			Cloroquina	Mefloquina	Primaquina	Lumefantrina
STB09	----	CQD	1600,00	8000,00	1600,00	1600,00
STB08	8	----	1000,00	5000,00	1000,00	1000,00
STB07	7	CQA	800,00	4000,00	800,00	800,00
STB06	6	CQM	400,00	2000,00	400,00	400,00
STB05	5	----	200,00	1000,00	200,00	200,00
STB04	4	CQC	100,00	200,00	20,00	20,00
STB03	3	----	50,00	100,00	10,00	10,00
STB02	2	CQB	20,00	50,00	5,00	5,00
STB01	1	LIQ	10,00	20,00	2,00	2,00

Nota: As soluções de trabalho apresentaram-se duas vezes mais concentradas do que a concentração na matriz biológica devido à diluição de duas vezes ocorrida no momento de extração do método bioanalítico.

Fonte: (Do autor, 2016).



### 3.1.5 Preparo da solução estoque do padrão interno carbamazepina

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 5,02 mg de carbamazepina (INCQS, teor 99,7%), e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), conforme o preparo descrito na seção 3.1.2.6., seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de carbamazepina.

#### 3.1.5.1 Preparo da solução de trabalho do padrão interno carbamazepina

Em um balão volumétrico de 250 mL foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), conforme o preparo descrito na seção 3.1.2.6. A esse volume foi adicionado com auxílio de uma pipeta automática (Gilson, P1000) 0,500 mL da solução estoque de carbamazepina, seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa homogeneização da solução, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 2000 ng/mL de carbamazepina.

### 3.1.6 Preparo da solução estoque das substâncias interferentes cafeína e nicotina

As soluções estoque das substâncias interferentes foram pesadas e preparadas individualmente, utilizando padrões analíticos certificados, balança analítica (Shimadzu, AUW220D) de precisão 0,00001 g e vidrarias calibradas.

### *3.1.6.1 Solução padrão estoque de cafeína 1 mg/mL*

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 4,96 mg de cafeína (Sigma-Aldrich, teor 100,8%), e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), conforme o preparo descrito na seção 3.1.2.6., seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de cafeína.

### *3.1.6.2 Solução padrão estoque de nicotina 1 mg/mL*

Foi pesado em balança analítica de precisão 0,00001g (Shimadzu, AUW220D), 15,38 mg de nicotina bitartrato dihidratado (correspondente a 5,00 mg de nicotina base livre) (USP, teor 99,9%), e todo o padrão analítico pesado foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A essa massa foi adicionada uma quantidade q.s. de solução de diluição metanol (J.T.BAKER, 99,9% grau HPLC/UV)/ água ultrapurificada (Millipore, Milli-Q, Q-POD, Integral 10), (80:20, v/v), conforme o preparo descrito na seção 3.1.2.6., seguido de agitação vigorosa em agitador de tubos manual tipo vórtex (Phoenix AP56). Após a completa dissolução do padrão analítico, o balão volumétrico foi aferido até a marca de referência com a mesma solução inicial, originando uma solução de concentração equivalente a 1 mg/mL de nicotina.

### *3.1.6.3 Preparo da solução de trabalho dos fármacos concomitantes/interferentes*

A solução estoque de nicotina preparada conforme a seção 3.1.6.2. foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. nas proporções de 1/100 em balão volumétrico calibrado de capacidade de 10 mL respectivamente, originando uma solução intermediária com concentração de 10000 ng/mL.

A solução intermediária de nicotina com concentração de 10000 ng/mL foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balão volumétrico calibrado de 10 mL, originando uma solução de trabalho com concentração de 200 ng/mL.

A solução estoque de cafeína preparada conforme a seção 3.1.6.1. foi diluída utilizando a solução de diluição descrita no item 3.1.2.6. em balão volumétrico calibrado de 10 mL, originando uma solução de trabalho com concentração de 20000 ng/mL.

As soluções foram preparadas de maneira simultânea, onde a solução de trabalho referente aos fármacos concomitantes/ interferentes apresentou concentração de 200 ng/mL para a nicotina e 20000 ng/mL para a cafeína.

## **3.2 Validação do método bioanalítico**

### **3.2.1 Infusão dos compostos no espectrômetro de massas**

Em uma etapa inicial do desenvolvimento foi necessário que os parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas estivessem otimizados. Para tal procedimento, foram preparadas soluções estoque das cinco substâncias (quatro analitos e um padrão interno) a serem monitoradas, conforme descrito nos itens 3.1.3. e 3.1.5.

Em seguida as soluções estoque foram diluídas de formas sucessivas para 1:100 e em seguida novamente para 1:100, onde a concentração final de cada uma das soluções dos analitos e do padrão interno foi de 100 ng/mL.

A solução de 100 ng/mL de cada substância foi infundida no espectrômetro de massas (tabela 11) de maneira individual através de uma seringa de vidro de 1 mL de capacidade (Hamilton, Syr 1001TLL, 1,0 mL) acoplada a uma bomba infusora (Harvard Apparatus 11 Plus) a um fluxo de 20  $\mu$ L/min.

Tabela 11 - Equipamento analítico utilizado para a quantificação dos antimaláricos.

Equipamento/módulo	Marca	Modelo
Espectrômetro de massas	ABSCIEX	API 5500 LC-MS/MS
Bombas de CLAE	Shimadzu	Nexera XR LC-20ADxr
Injetor automático	Shimadzu	Nexera XR SIL-20ACxr
Degaseificador	Shimadzu	Nexera XR DGU-20A5R
Módulo de comunicação	Shimadzu	Nexera XR CBM-20A
Forno de coluna	Shimadzu	Nexera XR CTO-20AC
Software	Analyst API 5500	1.6.1

Fonte: (Do autor, 2016).

Os parâmetros de detecção dependentes do analito *Declustering Potential* (DP), *Entrance Potential* (EP), *Collision Energy* (CE) e *Collision Cell Exit Potential* (CXP) e dependentes da fonte *Curtain Gas* (CUR), *Collision Gas Intensity*, *Ionspray Voltage* (IS), *Source Temperature* (TEM), *Ion Source Gas 1* (GAS1) e *Ion Source Gas 2* (GAS2) foram otimizados de maneira a apresentar a melhor intensidade para cada íon monitorado.

### 3.2.2 Linearidade

Uma vez definido o desenho do estudo e o  $C_{\text{máx}}$  esperado (com base em artigos científicos disponíveis na literatura), para cada um dos quatro analitos objeto da pesquisa, foi estabelecido o intervalo de concentração do estudo de linearidade para cada uma das substâncias. Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário contendo os quatro analitos de interesse, de forma que uma curva de calibração pudesse ser preparada de maneira simultânea.

### 3.2.3 Protocolo de validação do método bioanalítico

O método bioanalítico desenvolvido foi validado seguindo as normas presentes na resolução RDC N° 27, de 17 de maio de 2012 (Anexo A) e pela nota técnica 04/2014 (Anexo B), publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A RDC N° 27 dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados para fins de registro e pós registro de medicamentos e é complementada pela NT 04/2014, com orientações sobre ensaios a serem realizados quando houver a administração de fármacos de uso concomitante durante estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência.

Todos os ensaios previstos nas resoluções da ANVISA foram realizados em equipamentos qualificados (sistema ABSciex API QTRAP 5500) e certificados por técnicos capacitados da empresa responsável pelo equipamento (ABSciex Brasil Ltda).

#### *3.2.3.1 Teste de quantificação Inicial (TQI)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

O ensaio foi realizado através da análise de 36 amostras no total, uma curva de calibração contendo os 8 níveis de calibração para cada um dos quatro analitos (conforme tabela 10) em duplicata, 2 amostras de branco de matriz biológica isento de analitos e padrão interno (BSN) e 2 brancos de matriz biológica contendo o padrão interno (BSZ), totalizando 20 amostras de calibração e 16 amostras de controle de qualidade sendo 8 controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e 8 controles de qualidade de alta concentração (CQA).

#### *3.2.3.2 Teste de estabilidade em condições de análise (TEBCA)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5. O ensaio foi realizado através da análise de 36 amostras no total, uma curva de calibração recém preparada contendo os 8 níveis de calibração para cada um dos quatro analitos (conforme tabela 10) em duplicata, 2 amostras de branco de matriz biológica isento de analitos e padrão interno (BSN) e 2 brancos de matriz biológica contendo o padrão interno (BSZ), totalizando 20 amostras de calibração e 16 amostras de controle de qualidade.

Foram analisadas 16 amostras de controle de qualidade sendo 8 controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e 8 controles de qualidade de alta

concentração (CQA) preparadas no dia do teste de quantificação inicial e após serem submetidos a exposição sobre a bancada à temperatura ambiente, por um determinado período de tempo.

### *3.2.3.3 Teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

O ensaio foi realizado através da análise de 36 amostras no total, uma curva de calibração recém preparada contendo os 8 níveis de calibração para cada um dos quatro analitos (conforme tabela 10) em duplicata, 2 amostras de branco de matriz biológica isento de analitos e padrão interno (BSN) e 2 brancos de matriz biológica contendo o padrão interno, totalizando 20 amostras de calibração e 16 amostras de controle de qualidade. Foram extraídas e analisadas 16 amostras de controle de qualidade sendo 8 controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e 8 controles de qualidade de alta concentração (CQA) extraídas no dia do teste de quantificação inicial e após serem submetidos ao armazenamento no auto-injetor após o seu preparo, por um determinado período de tempo.

### *3.2.3.4 Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e degelo (TEBCD)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

O ensaio foi realizado através da análise de 36 amostras no total, uma curva de calibração recém preparada contendo os 8 níveis de calibração para cada um dos quatro analitos (conforme tabela 10) em duplicata, 2 amostras de branco de matriz biológica isento de analitos e padrão interno (BSN) e 2 brancos de matriz biológica contendo o padrão interno (BSZ), totalizando 20 amostras de calibração e 16 amostras de controle de qualidade.

Foram extraídas e analisadas 16 amostras de controle de qualidade, fortificadas no dia do teste de quantificação inicial, sendo 8 controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e 8 controles de qualidade de alta concentração (CQA). O procedimento de análise foi realizado após as amostras serem submetidas

a ciclos de congelamento em freezer e descongelamento sob temperatura ambiente, por um determinado período de tempo.

#### *3.2.3.5 Teste de estabilidade de longa duração (TEBLD)*

Foram preparadas 16 amostras de controle de qualidade sendo 8 controles de qualidade de baixa concentração (CQB) e 8 controles de qualidade de alta concentração (CQA) no dia do teste de quantificação inicial. Estas amostras foram submetidas ao armazenamento em freezer (Brastemp 280) em uma temperatura média de -25 °C.

Até o momento do término deste trabalho, o período compreendido entre o armazenamento das amostras de CQB e CQA sob estabilidade de longa duração, armazenadas em freezer, se mostrou inferior ao tempo de armazenamento das amostras de pacientes coletadas para o estudo. Sendo assim o teste de estabilidade de longa duração ainda não foi realizado.

#### *3.2.3.6 Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise (TEBSCA)*

Foram preparadas quatro soluções estoque, uma para cada analito do estudo (cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina), e uma solução de trabalho com concentração correspondente ao LIQ contendo todos os quatro analitos conforme descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4.

Do mesmo modo, foi preparada uma solução estoque e uma solução de trabalho de uso diário para o padrão interno carbamazepina, conforme item 3.1.5

As soluções de trabalho foram expostas sob condições de análise à temperatura ambiente. Após o período de estabilidade, foram preparadas novas soluções de trabalho da mesma maneira do que as soluções preparadas no início do ensaio.

As soluções de trabalho submetidas ao período de estabilidade sob condições ambiente foram comparadas com as soluções recém preparadas tanto para os quatro analitos do estudo, quanto para o padrão interno, através das áreas dos picos cromatográficos obtidos no espectrômetro de massas, onde as médias das áreas entre as soluções de trabalho foram avaliadas.

### 3.2.3.7 *Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA)*

Foram preparadas quatro soluções estoque, uma para cada analito do estudo (cloroquina, primaquina, mefloquina e lumefantrina), e uma solução de trabalho com concentração correspondente ao LIQ contendo todos os quatro analitos conforme descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4.

Do mesmo modo, foi preparado uma solução estoque e uma solução de trabalho de uso diário para o padrão interno carbamazepina, conforme item 3.1.5.

As soluções de trabalho foram submetidas às mesmas condições de armazenamento das amostras dos pacientes coletadas para o estudo, em freezer (Brastemp 280, a - 25° C) iniciando assim o período de estabilidade.

Após um determinado período de armazenamento em freezer, foram preparadas novas soluções de trabalho da mesma maneira do que as soluções preparadas no início do ensaio.

As soluções de trabalho submetidas ao período de estabilidade sob condições de armazenamento foram comparadas com as soluções recém preparadas, tanto para os quatro analitos do estudo, quanto para o padrão interno através das áreas dos picos cromatográficos obtidos no espectrômetro de massas, onde as médias das áreas entre as soluções de trabalho foram avaliadas.

### 3.2.3.8 *Teste de seletividade (TSE)*

A seletividade foi realizada com o preparo (extração) de seis amostras de branco de sangue normal de cinco fontes distintas de matriz e de uma amostra de matriz biológica proveniente de origem lipêmica.

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Estas amostras de branco foram comparadas com uma amostra correspondente ao LIQ dos quatro analitos do estudo cujas concentrações encontram-se na tabela 10, extraída com uma das bolsas de sangue total normal utilizadas para o preparo das amostras branco.

A resposta das áreas dos picos cromatográficos obtidos pelo espectrômetro de massas para os quatro analitos e para o padrão interno foram comparadas com as seis amostras de branco extraídas.



### 3.2.3.9 *Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes (TSEFC)*

A seletividade foi realizada com o preparo (extração) de seis amostras de branco de sangue normal, de cinco fontes distintas de matriz e de uma amostra de matriz biológica proveniente de origem lipêmica.

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina, conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Durante a extração destas amostras, foi adicionada uma solução de trabalho contendo os fármacos concomitantes/interferentes nicotina e cafeína, preparadas conforme item 3.1.6.

As amostras branco foram comparadas com uma amostra correspondente ao LIQ dos quatro analitos do estudo cujas concentrações encontram-se na tabela 10, extraída com uma das bolsas de sangue total normal utilizadas para o preparo das amostras branco.

A resposta das áreas dos picos cromatográficos obtidos pelo espectrômetro de massas para os quatro analitos e para o padrão interno foram comparadas com as seis amostras de branco extraídas.

### 3.2.3.10 *Teste de efeito de matriz (TEM)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Após o preparo das soluções de trabalho, foram extraídas seis amostras referentes às concentrações do CQB e seis amostras referentes ao CQA para os quatro analitos do estudo conforme tabela 10, sendo quatro amostras utilizando bolsas de matriz normal de fontes distintas e duas utilizando bolsas de matriz lipêmicas de fontes distintas, para cada uma das duas concentrações dos controles de qualidade. Estas amostras foram comparadas com seis amostras referentes as concentrações do CQB e seis amostras referentes ao CQA para os quatro analitos do estudo preparadas com a utilização da solução de diluição descrita no item 3.1.2.9, substituindo a matriz biológica.

Para cada amostra foi obtido o fator matriz normalizado pelo padrão interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

O FMN foi avaliado conforme parâmetros presentes na legislação em vigor.

#### 3.2.3.11 *Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes (TEMFC)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Após o preparo das soluções de trabalho, foram extraídas seis amostras referentes as concentrações do CQB e seis amostras referentes ao CQA para os quatro analitos do estudo conforme tabela 10, sendo quatro amostras utilizando bolsas de matriz normal de fontes distintas e duas utilizando bolsas de matriz lipêmicas de fontes distintas, para cada uma das duas concentrações dos controles de qualidade.

Durante a extração destas amostras, foi adicionada uma solução de trabalho contendo os fármacos concomitantes/interferentes nicotina e cafeína, preparadas conforme item 3.1.6.

Estas amostras foram comparadas com seis amostras referentes as concentrações do CQB e seis amostras referentes ao CQA para os quatro analitos do estudo porém com a utilização da solução de diluição descrita no item 3.1.2.9.

Para cada amostra foi obtido o fator matriz normalizado pelo padrão interno (FMN), conforme a fórmula apresentada no item 3.2.3.10.

#### 3.2.3.12 *Teste de efeito residual (TER)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Após o preparo das soluções de trabalho foram preparadas (extraídas) três amostras para a avaliação do efeito residual, uma amostra de branco de matriz biológica isenta dos analitos monitorados e do padrão interno (BSN) e duas amostras referentes a linearidade proposta para cada uma dos quatro analitos. Conforme apresentado na tabela 10, a primeira amostra corresponde ao limite

inferior de quantificação (LIQ) a segunda amostra correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ).

O ensaio foi realizado através da injeção da amostra BSN, seguido pela injeção das amostras de LIQ e LSQ. Após o término da injeção das amostras em matriz biológica contendo os analitos do estudo nas concentrações menos elevada e mais elevada da linearidade desenvolvida, a amostra de BSN foi injetada novamente por mais duas vezes onde foi realizada uma comparação das injeções da amostra branco.

A resposta das áreas dos picos cromatográficos obtidos pelo espectrômetro de massas para os brancos de matriz biológica, foram comparados antes e depois da injeção da amostra referente ao LSQ para os analitos do estudo e para o padrão interno (CBZ), onde a presença de contaminantes próximas ao tempo de retenção dos analitos foi avaliada.

#### *3.2.3.13 Teste de precisão e exatidão (TPE)*

Foram preparadas soluções de trabalho de uso diário para os quatro analitos e para o padrão interno carbamazepina conforme itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Para a avaliação do teste de precisão e exatidão foram extraídas e analisadas 60 amostras no total, uma curva de calibração contendo os 8 níveis de calibração para cada um dos quatro analitos (conforme tabela 10) em duplicata, 2 amostras de branco de matriz biológica isento de analitos e padrão interno (BSN) e 2 brancos de matriz biológica contendo o padrão interno (BSZ), totalizando 20 amostras de calibração e 40 amostras de controle de qualidade sendo 8 controles de qualidade referentes a cada uma das concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de concentração diluída (CQD), definidas na tabela 10.

O procedimento foi repetido por três dias distintos onde foi realizada a avaliação da precisão e exatidão em dois parâmetros diferentes: a precisão e exatidão em relação ao coeficiente de variação entre a média das amostras de controles de qualidade preparadas em um mesmo dia, assim como sua exatidão e desvio em relação ao valor nominal (precisão intradia) e o coeficiente de variação entre as médias de amostras de controles de qualidade preparadas em dias

diferentes, assim como sua exatidão e desvio em relação ao valor nominal (precisão interdia).

O teste de diluição foi realizado através da diluição de amostras de controle de qualidade que apresentavam concentração acima da curva de calibração, após a adição de partes iguais de matriz biológica contendo os analitos do estudo e isenta dos analitos do estudo e quantificadas juntamente com os demais controles de qualidade através de uma curva de clibração

### **3.3 Análise das amostras em matriz biológica dos indivíduos em tratamento contra a malária**

#### **3.3.1 Caracterização da população do trabalho**

Uma vez que foram utilizados no trabalho voluntários sadios para a doação da matriz biológica sangue total e indivíduos em tratamento contra a malária, é importante destacar que a participação de todos os voluntários foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa clínica (CEP) de N° 74869 de 07/08/2012 e N° 644709 de 11/04/2014. (Apêndice A).

O público alvo utilizado no presente trabalho foram 176 indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos e peso entre 50 e 90 Kg, originados da área endêmica de paludismo do Brasil, localizada na região norte do país, moradores atuais de localidades em Amazonas e Rondônia, que se encontravam em tratamento contra a malária não complicada causada por *Plasmodium vivax*, através dos esquemas terapêuticos recomendados pelo Programa Nacional de Controle da Malária (terapia combinada dos derivados da artemisinina), que são associações dos medicamentos atualmente disponibilizados pelo SUS.

#### **3.3.2 Transporte e armazenagem das amostras em matriz biológica**

A amostra de matriz biológica adsorvida em papel filtro contido em microtubo de polipropileno de capacidade para 2 mL foi armazenada à temperatura ambiente, quando em campo durante a coleta dos pacientes em tratamento contra a malária e durante o período de armazenamento no centro clínico em freezers a - 25 °C.

O transporte das amostras foi realizado por via aérea e terrestre, onde os microtubos contendo as amostras biológicas adsorvidas em papel filtro foram

transportados em embalagem plástica rotulada pelo número do paciente, contendo todos os seus tempos de coleta e suas réplicas, climatizados a - 25 °C em um recipiente de isopor, onde a temperatura de transporte foi monitorada através de sistema de datalogger.

Uma vez que as amostras dos pacientes foram recebidas pelo laboratório analítico, estas foram estocadas em freezer (Brastemp 280) na temperatura de - 25 °C onde permaneceram armazenadas até o momento de sua análise, fato ocorrido após o término do processo de validação do método bioanalítico.

Todo o processo de transporte, recebimento e armazenagem das amostras biológicas foi registrado em formulários físicos e eletrônicos, assim como em log-books do laboratório bioanalítico a fim de se garantir sua rastreabilidade e segurança dos dados.

### 3.3.3 Tempos de coleta dos indivíduos sob tratamento da malária

Os tempos de coleta das amostras dos pacientes em tratamento contra a malária foram definidos com base em dados presentes na literatura científica onde o longo tempo de meia vida de eliminação da cloroquina (MILLER et al, 2013), mefloquina (VALEA et al, 2014) e lumefantrina (PLESSIS et al, 2015) foi um fator fundamental para a escolha do desenho do estudo.

Por possuir caráter secundário em um esquema de tratamento contra a malária (OMS 2015), os tempos de coleta não foram otimizados para a primaquina, cujo tempo de meia vida é bastante curto, totalizando em poucas horas sua completa eliminação (POTTER et al, 2015).

### 3.3.4 Preparo das corridas analíticas de amostras de indivíduos sob tratamento da malária

Para a análise dos indivíduos em tratamento contra a malária, foram preparadas corridas analíticas contendo uma curva de calibração utilizando soluções estoque e soluções de trabalho preparadas conforme os itens 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5. com oito níveis de calibração em duplicata, para os quatro analitos do estudo de maneira simultânea, cujas concentrações são apresentadas na tabela 10, duas amostras de branco de matriz isentas de analito e padrão interno (BSN) e duas

amostras de branco de matriz contendo o padrão interno (BPZ), totalizando 20 amostras.

Foram preparados também, em média, oito controles de qualidade de concentrações correspondentes ao CQB, CQC, CQM e CQA para cada um dos quatro analitos do estudo de maneira simultânea, com concentrações apresentadas na tabela 10, totalizando 32 amostras.

Na corrida analítica foram extraídas e analisadas em média amostras equivalentes a dez indivíduos, com os tempos de coleta propostos, totalizando em média 80 amostras por corrida analítica.

Cada corrida analítica apresentou, em média, 132 amostras extraídas no total que foram avaliadas segundo os parâmetros presentes na legislação em vigor da ANVISA (RDC nº27).

#### **3.4 Avaliação dos resultados bioanalíticos referentes às amostras dos indivíduos do estudo em tratamento contra a malária para a verificação da adesão ao tratamento**

Os dados quantificados obtidos das amostras de indivíduos em tratamento contra a malária foram avaliados de maneira a confirmar se houve a adesão ao tratamento.

Para que fosse possibilitado o estudo de eficácia do tratamento com os medicamentos administrados e esquemas terapêuticos utilizados segundo o Programa Nacional de Controle da Malária do Governo Federal, os dados com as concentrações das amostras de material biológico sangue coletadas dos pacientes participantes da pesquisa, foram enviadas aos centros de pesquisa clínica responsáveis pela coleta das amostras e monitoramento clínico dos pacientes participantes do estudo, localizados em Amazonas e Rondônia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

Com base na pesquisa de dados presentes na literatura referente aos métodos bioanalíticos desenvolvidos e técnicas de análise realizadas, foi desenvolvido um método bioanalítico para a quantificação simultânea de cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina, em matriz biológica sangue total, adsorvida em papel filtro, com detecção por CLAE/EM/EM.

Buscando as melhores condições para o método bioanalítico foi decidido que MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) seria utilizado como solvente para solubilizar as soluções estoque oriundas da pesagem das substâncias químicas de referência realizadas na balança analítica, uma vez que este solvente seria o mais apropriado para a solubilização das substâncias do estudo. Mesmo após Wahajuddin et al (2009) terem preparado as soluções de trabalho de lumefantrina apenas em metanol e Blessborn et al (2007) utilizado MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) para o preparo de soluções de trabalho para o fármaco lumefantrina, a adição de um volume maior de metanol favoreceu a completa solubilização da maioria das substâncias antimaláricas.

Apesar dos autores mencionados acima terem realizado a solubilização de lumefantrina em soluções de metanol 100% e metanol a 50%, devido à conhecida baixa solubilidade em solventes orgânicos e em água da lumefantrina, foi necessária a adição de ácido fórmico na concentração de 0,1%, como empregado por César (2009) e Huang et al (2010) para a completa solubilização desta substância antes do processo de infusão.

Como parte inicial do desenvolvimento foi preparada uma solução na concentração de 1 mg/mL de todas as substâncias a serem monitoradas em MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). Após uma diluição para uma concentração que pudesse ser apropriada à faixa do detector do equipamento foi realizada a infusão das substâncias no sistema analítico, buscando a otimização das condições de análise do equipamento. Todas as outras substâncias também foram totalmente solubilizadas utilizando-se a solução descrita anteriormente.

As transições monitoradas no modo eletrospray positivo (ESI+) para os íons dos quatro analitos e para o padrão interno obedeceram aos critérios de massa molecular somada a um próton para os íons precursores e fragmentos mais

intensos, livres de interferentes próximos ao tempo de retenção da formação dos picos cromatográficos para as substâncias. Assim, foram monitoradas as transições da cloroquina (m/z) (320,0>247,0), mefloquina (m/z) (379,0>321,0), primaquina (m/z) (260,0>85,9, lumefantrina (m/z) (530,2>512,1) e carbamazepina (m/z) (237,0>194,1). Foi observado que as transições iônicas monitoradas pelo método desenvolvido foram encontradas em publicações presentes na literatura científica (HODEL et al, 2009; NA-BANGCHANG, 2014; SENNER et al, 2007; AVULA et al, 2012; POLAGANI et al, 2013).

Apesar do íon produto da lumefantrina com relação massa/carga m/z 512,1 corresponder à perda de água, o mesmo foi monitorado por apresentar a intensidade de sinal muito superior ao fragmento de m/z 348,0 e não possuir interferência no seu canal de monitoramento de transição, assim como estabilidade de análise. Critérios esses não observados para a mefloquina, onde o íon produto com relação massa/carga m/z 361,0 (perda de água em relação ao íon precursor m/z 379,0), apresentou interferência próxima ao tempo de retenção da formação do pico cromatográfico da mefloquina, nas amostras de branco de matriz e branco de matriz adicionada de padrão interno. Sendo assim, o fragmento monitorado como íon produto da mefloquina foi alterado para m/z 321,0 (MARSON et al, 2017).

Após a otimização das condições instrumentais foram analisadas amostras diluídas em solução, sem a utilização de matriz biológica. Este procedimento foi realizado antes mesmo do processo de extração ser definido de maneira com que as condições analíticas do equipamento pudessem ser avaliadas. Singhal e colaboradores em 2007 propuseram uma fase móvel aquosa contendo 10 mmol/L de acetato de amônio para a cloroquina e para o desenvolvimento do método bioanalítico em um primeiro momento foi utilizado como fase móvel aquosa água/acetato de amônio 10 mmol/L + ácido fórmico q.s.p. pH 3,00 e como fase móvel orgânica metanol.

Uma coluna cromatográfica ACE C8, com dimensões 150 mm x 4,6 mm x 5 µm (comprimento x diâmetro interno x tamanho de partícula) foi utilizada, uma vez que a composição de octasilano possibilitou uma interação da cloroquina com a fase estacionária menor que aquela apresentada pela utilização de uma coluna composta por octadecilsilano, uma vez que um dos analitos analisados (cloroquina) possuía alto teor hidrofílico, o que confirmaria sua alta polaridade (RANG et al, 2012). Foi



observado divisão do pico cromatográfico da cloroquina, o que sugeriu que não houve uma boa interação desta substância no sistema fase móvel/fase estacionária.

Em relação à parte cromatográfica, o aumento na concentração do tampão acetato de amônio na fase móvel aquosa, inicialmente de 10 mmol/L para 100 mmol/L, como realizado por Bevan et al (1997), favoreceu a interação deste fármaco com a coluna cromatográfica testada, uma vez que a cloroquina possui característica química polar. Essa mudança provocou uma elevação da afinidade da cloroquina com a fase estacionária diretamente proporcional ao aumento da concentração de acetato de amônio, o que proporcionou uma passagem homogênea deste analito pelas bandas da coluna cromatográfica diminuindo a difusão do composto e permitindo a análise desta substância sem que fosse observada a divisão do pico referente à sua resposta analítica.

Com a mudança da fase móvel orgânica de metanol para acetonitrila não foram observadas melhorias significativas para a cloroquina, porém foi testada uma combinação desses solventes até a otimização da fase orgânica para a concentração final de metanol/acetonitrila (80:20, v/v), o que representou uma melhora significativa na simetria dos picos cromatográficos da cloroquina em relação à redução do fator de cauda. Esta proporção de no máximo 20% de acetonitrila foi definida uma vez que a utilização deste solvente orgânico na fase móvel não favorece a formação dos picos cromatográficos da primaquina, como demonstrado por Na-Bangchang et al (2014) e Li et al (1995), que utilizaram metanol como fase móvel orgânica, contendo hidróxido de amônio ou dietilamina como aditivo em sua fase móvel aquosa.

A literatura descreve para análise cromatográfica de lumefantrina colunas fenil (tipo Zorbax Eclipse XDB-phenyl) e propil pentanofluorfenil (tipo Phenomenex Luna, PFP) (NTALE et al, 2008; GOVENDER et al, 2015). Uma vez que não houve disponibilidade dessas colunas na central bioanalítica foram testadas as seguintes colunas: Agilent C18 Pursuit 150 mm x 3,0 mm x 5 µm, Waters X-Bridge 150 mm x 3,0 mm x 5 µm, Agilent C18 Omnisphere 150 mm x 4,6 mm x 5 µm e Waters Sunfire 50 mm x 4,6 mm x 5 µm. Em todas estas colunas analíticas citadas foi observada a ausência de sinal cromatográfico para o fármaco lumefantrina, mesmo quando uma solução de alta concentração foi analisada, o que sugere que esta substância possui uma maior afinidade com a fase estacionária do que com as fases móveis testadas.

Uma nova linha de experimentos foi iniciada com a utilização de colunas contendo menos carbonos na sua composição ativa, de forma que a interação da lumefantrina com a fase estacionária pudesse ser menor que a interação com a fase móvel e a substância pudesse ser carregada através da coluna analítica evitando assim que o fármaco ficasse retido na fase estacionária.

De acordo com a nova condição analítica observada, durante o desenvolvimento do método analítico não foram mais utilizadas colunas C18, sendo as mesmas substituídas por colunas C8, visando uma menor interação das substâncias com a coluna analítica. Dessa forma, a fase móvel utilizada poderia interagir melhor com as substâncias e possibilitar uma melhor análise.

Uma boa condição analítica foi observada com a utilização da coluna ACE C8 150 mm x 4,6 mm x 5 µm e com a utilização de fases móveis aquosa e orgânica sendo respectivamente, água / acetato de amônio 100 mmol/L / ácido fórmico q.s.p. pH 3,00 e metanol / acetonitrila (80:20) na proporção otimizada de 30% de fase aquosa e 70% de fase orgânica. Todas as substâncias apresentaram uma boa cromatografia e interação com a coluna cromatográfica, sendo realizada dessa maneira a separação cromatográfica das substâncias monitoradas de seus interferentes.

Apesar da nova condição analítica, a lumefantrina apresentou alto tempo de retenção (acima de 10 minutos) mesmo com a utilização da coluna ACE C8, o que sugeriu que a proporção do solvente orgânico utilizado em 70% não possuía força suficiente para reduzir a interação dessa substância com a coluna analítica. O aumento de maneira gradativa da proporção de solvente orgânico na fase móvel para até 90% possibilitou uma boa condição de simetria de pico cromatográfico e um baixo tempo de retenção, de cerca de 4 minutos para a lumefantrina, conforme observado por Mounika et al (2015), quando foi utilizada uma fase móvel de 85% de acetonitrila e 15% de acetato de amônio 100 mmol/L em água com pH ajustado para 4,9 com ácido fórmico para a separação em uma coluna Purospher STAR RP-18 *end capped*. Porém, nesta condição de alta proporção de solvente orgânico (> 80%) houve uma piora considerável nas condições cromatográficas de todos os outros fármacos monitorados, onde a primaquina e a mefloquina apresentaram seus picos cromatográficos na região do volume morto do sistema. A cloroquina, por sua vez, apresentou um aumento da assimetria cromatográfica, uma vez que seu fator de cauda foi afetado pelo aumento da proporção de solvente orgânico e o aparecimento

da cauda no pico. Esta condição havia sido sanada com a adição de acetato de amônio na fase aquosa em uma concentração bastante elevada de 100 mmol/L.

A proporção da fase móvel aquosa/orgânica foi otimizada e definida como (25:75, v/v), respectivamente, de maneira que o tempo de retenção da lumefantrina fosse reduzido para 8 minutos e não houvesse interferências significativas na análise das demais substâncias do estudo.

Um recurso utilizado para que o tempo de retenção da lumefantrina pudesse ser reduzido foi a substituição da coluna ACE C8 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, por uma ACE C8 100 mm x 3,0 mm x 5 µm. Devido ao comprimento e diâmetro interno desta coluna analítica serem menores, foi observado que a lumefantrina interagiu menos com a fase estacionária e conseqüentemente apresentou menor tempo de retenção.

Foi testado a utilização de um gradiente de proporção para a fase móvel utilizada no sistema, uma vez que é bastante comum a utilização desta condição de fase móvel, como citado por Kjellin et al (2014). Porém, foi observado um aumento significativo da linha de base do canal da lumefantrina, em sua região de retenção do pico cromatográfico durante a realização deste procedimento.

Foi constatado que para as baixas concentrações pretendidas no monitoramento desta substância pelo estudo (1 ng/mL para o LIQ da lumefantrina), a alteração da linha de base promovida pela utilização do gradiente de proporção da fase móvel impossibilitou a formação de picos cromatográficos satisfatórios para os níveis de calibração mais baixos presentes na curva de calibração.

Uma vez que foi descartada a utilização do gradiente de eluição para a fase móvel, foi realizada a otimização de um gradiente de fluxo, que apresentou resultados bastantes satisfatórios, uma vez que com o aumento do fluxo da análise não foram observadas alterações significativas na cromatografia das outras substâncias monitoradas (cloroquina, mefloquina, primaquina e carbamazepina).

O gradiente foi definido com a mudança do fluxo sendo realizada após o tempo de retenção das outras três substâncias monitoradas pelo estudo (cloroquina, mefloquina e primaquina) e do padrão interno (carbamazepina). Foi utilizado como gradiente de fluxo os valores de 1,00 mL/min e 1,20 mL/min, na proporção de 25% de fase móvel aquosa e 75% de fase móvel orgânica, o que possibilitou a redução do tempo de retenção da lumefantrina sem que fossem observadas interferências na região da linha de base causada pela mudança do gradiente.

Como parte final do desenvolvimento do método bioanalítico foram realizados testes com o objetivo de reduzir a concentração do acetato de amônio da fase aquosa de 100 mmol/L de maneira a manter a integridade do sistema cromatográfico, com a prevenção do entupimento da coluna analítica e das linhas de transmissão do equipamento devido ao acúmulo e cristalização excessiva de sal no sistema.

Como foi observada de maneira experimental a afinidade da cloroquina e mefloquina com acetato de amônio, foram realizados testes com concentrações decrescentes de acetato de amônio na fase aquosa nas concentrações de 100 mmol/L a 10 mmol/L, com a utilização de fase orgânica metanol/acetonitrila (80:20, v/v) e gradiente de fluxo de 1,00 mL/min e 1,20 mL/min, na proporção de 25% de fase móvel aquosa e 75% de fase móvel orgânica.

A fase móvel que apresentou o melhor resultado foi a preparada com 40 mmol/L, uma vez que a cloroquina e a mefloquina não apresentaram alterações prejudiciais em suas condições cromatográficas. Valores de concentração abaixo de 40 mmol/L de acetato de amônio promoveram a bipartição de picos cromatográficos para a cloroquina e a falta de robustez dos resultados para a mefloquina.

Outro parâmetro otimizado foi o valor de pH da fase móvel aquosa. A lumefantrina por ser um composto altamente lipofílico, apresenta características insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos, porém, se torna solúvel em alguns solventes orgânicos, como metanol ou acetonitrila na presença de ácido (PINGALE e MANGAONKAR, 2012). Sendo assim, o pH ácido da fase móvel diminuiu a interação físico-química da lumefantrina com a coluna de separação analítica composta de octilsilano, uma vez que em pH ácido a molécula da lumefantrina estará ionizada no grupo amina, logo a interação com a fase estacionária de octilsilano será menor.

Foram realizados testes com o objetivo de definir a melhor condição de pH a ser utilizada na fase móvel aquosa. O processo de otimização foi realizado comparando a corrida analítica de amostras contendo os analitos do estudo em uma mesma concentração, injetadas no sistema analítico utilizando a fase móvel aquosa preparada, contendo o sal de acetato de amônio na concentração de 40 mmol/L ajustada com ácido fórmico para pH 2,00, 2,50, 3,00, 3,50, 4,00, 4,50 e 5,00. Este teste foi realizado de maneira que o comportamento dos analitos do estudo, em especial a lumefantrina, pudessem ser avaliados na presença de diversos valores de

pH. Não foram observadas alterações significativas nos demais analitos e no padrão interno, porém a lumefantrina de fato apresentou um menor tempo de retenção quando foi utilizada uma fase móvel aquosa mais ácida. Uma vez que o pKa desta substância se encontra próximo a 9, a ionização da amina terciária pela fase móvel ácida reduz a interação da lumefantrina com a fase estacionária de octasilano.

De acordo com o fabricante da coluna analítica utilizada (ACE) a faixa de pH descrita no certificado de controle de qualidade da coluna possibilita uma utilização apropriada entre 3,0 e 10,0. Dessa forma, foi realizada uma alteração no pH da fase móvel aquosa utilizada de 3,00 para 3,50 buscando a manutenção da vida útil da coluna cromatográfica. Esta alteração realizada não influenciou de maneira significativa as condições de análise dos quatro analitos de interesse do estudo.

Em relação ao padrão interno utilizado para a quantificação dos analitos, em artigos publicados pertencentes à literatura científica foram utilizadas substâncias de classe semelhante aos anti-maláricos, como halofantrina (NTALE et al, 2008), primaquina (NA-BANGCHANG et al, 1994) e piperaquina (MOORE et al, 2011). A fundamentação para a utilização de substâncias semelhantes aos analitos está relacionada ao procedimento de extração do método bioanalítico, para que as condições empregadas pudessem ser bastante parecidas às substâncias de interesse do trabalho, porém, não foi possível a utilização de substâncias de mesma classe dos analitos utilizados devido ao custo e tempo para obtenção.

Sendo assim foi utilizada carbamazepina como padrão interno. A escolha desta substância foi justificada pela ampla afinidade da mesma pelo solvente de extração, fase móvel, fase estacionária e condições cromatográficas utilizadas, sendo capaz de sofrer variações de maneira semelhante aos analitos do estudo (ARAÚJO, 2011).

Seguindo o objetivo principal do trabalho, o desenvolvimento de um método bioanalítico para a quantificação por espectrometria de massas de maneira simultânea dos fármacos cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina, utilizando sangue total como matriz biológica, foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica antes do desenvolvimento do procedimento de extração e metodologia de análise instrumental de maneira que pudesse ser levantado o maior número de informações presentes na literatura que possibilitassem a definição das melhores condições de análise.

Hellgren et al (1990) desenvolveram um método para quantificação de quinina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE/UV) a partir de amostras de sangue total adsorvidas em papel filtro.

Minzi et al (2002) publicaram um método capaz de quantificar cloroquina em sangue total adsorvido em papel filtro, plasma e urina através de detecção por CLAE/UV.

Page-Sharp et al (2012) utilizaram detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE/EM/EM), de maneira a quantificar a primaquina em amostras de plasma extraídas por técnica de cartuchos de fase sólida para a purificação das amostras.

Munjal et al (2010) utilizaram método desenvolvido utilizando matriz biológica plasma para quantificação de lumefantrina e aplicaram o método para estudos de bioequivalência/biodisponibilidade relativa.

Olliaro et al (2010) conduziram uma pesquisa capaz de quantificar mefloquina em plasma e compararam a biodisponibilidade entre voluntários saudáveis e pacientes em tratamento contra malária não-complicada causada por *P. falciparum*.

Morris et al (2011) estudaram a diferença da farmacocinética do artesunato e da dihidroartemisinina em mulheres grávidas e não-grávidas em tratamento contra malária não-complicada causada por *Plasmodium falciparum* assim como o estudo de Kim e colaboradores realizado em 2004 quantificando por CLAE/UV a cloroquina e a primaquina em amostras de matriz biológica plasma de pacientes coreanos tratados contra malária causada por *Plasmodium vivax*.

Hodel et al (2009) apresentaram um método capaz de quantificar simultaneamente 14 substâncias antimaláricas na matriz biológica plasma utilizando detecção por CLAE-EM/EM e um procedimento de extração relativamente simples através de precipitação de proteínas e evaporação do extrato final.

Entretanto, em todos os trabalhos citados não foram realizadas análises simultâneas de fármacos antimaláricos de características tão diferentes na matriz biológica sangue total adsorvida em papel filtro e utilizando a espectrometria de massas.

Hodel et al (2009) utilizaram plasma como matriz biológica e quantificaram 14 substâncias antimaláricas nesta matriz biológica por espectrometria de massas, precipitando proteínas plasmáticas.

O método apresentado por este trabalho realizou a extração em papel filtro de amostras adsorvidas em sangue total através de um método de extração relativamente simples, utilizando a técnica de extração líquido-líquido com a utilização de TBME e evaporação seguida de reconstituição em fase móvel. Esta técnica se mostrou relativamente superior a outros tipos de extração avaliadas durante o desenvolvimento do método bioanalítico como por exemplo, a extração por cartuchos de fase sólida e extração por precipitação de proteínas. A recuperação dos fármacos foi avaliada através das técnicas tradicionais de extração em matriz biológica com a utilização dos solventes mais comuns empregados em análise por cromatografia, como metanol, acetonitrila, acetato de etila e diclorometano, por exemplo, mas os melhores resultados foram obtidos através da extração líquido-líquido com TBME como citado anteriormente.

Levando-se em consideração que o método desenvolvido descrito neste trabalho analisou de maneira simultânea a cloroquina (hidrofílica, com alta afinidade por acetato de amônio), a mefloquina (hidrofílica, com alta afinidade por acetato de amônio), a primaquina (hidrofílica, com baixa afinidade por acetato de amônio) e a lumefantrina (lipofílica, com baixa afinidade por acetato de amônio), em sangue total adsorvidos em papel filtro, a obtenção de resultados robustos e dentro dos parâmetros presentes na legislação, permite afirmar que o método pode ser uma ferramenta eficaz para auxiliar o SUS no monitoramento do tratamento de pacientes tratados com antimaláricos no Brasil, objetivo principal deste trabalho.

A linearidade foi avaliada com base em artigos publicados sobre a análise de fármacos antimaláricos realizadas de maneira individual onde Na-Bangchang et al (1994) definiram como 5 ng/mL a 1000 ng/mL a linearidade de cloroquina, com  $C_{MÁX}$  838 ng/mL (656-1587 ng/mL), Gutman et al (2009) observaram  $C_{MÁX}$  2750 ng/mL (2550-3000 ng/mL) para a mefloquina, Fletcher et al (1981) observaram aproximadamente 250 ng/mL para a primaquina e Ezzet et al (2000) observaram que em plasma, para múltiplas doses, a lumefantrina pode chegar a  $C_{MÁX}$  6000 ng/mL, porém em sua primeira administração, esta substância apresentou uma média de 2000 ng/mL em sua concentração máxima.

Desse modo, após a avaliação dos dados presentes na literatura científica pesquisados e citados anteriormente, para a análise simultânea das substâncias antimaláricas apresentadas neste trabalho foi utilizada linearidade de 5 ng/mL até

500 ng/mL para a cloroquina, 10 ng/mL a 2500 ng/mL para a mefloquina, 1 ng/mL a 500 ng/mL para a primaquina e 1 ng/mL a 500 ng/mL para a lumefantrina.

## 4.2 Método bioanalítico desenvolvido

### 4.2.1 Condições finais dos íons precursores e produtos monitorados por CLAE-EM/EM

Os parâmetros de detecção e quantificação dependentes do analito e da fonte no espectrômetro de massas para as substâncias do presente trabalho otimizados de maneira individual para cada um dos quatro analitos do estudo (cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina) e para o padrão interno carbamazepina encontram-se apresentados nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Resultados otimizados dos parâmetros dependentes do analito no espectrômetro de massas.

Substância	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Scan time (msec)	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)	CEM (V)
Cloroquina	320,0	247,0	250,0	171	12	10	10	1900
Mefloquina	379,0	321,0	150,0	116	43	10	10	1900
Primaquina	260,0	86,0	300,0	66	21	10	8	1900
Lumefantrina	530,2	512,1	250,0	126	30	10	16	1900
* Carbamazepina	237,0	194,1	200,0	91	12	10	14	1900

Nota: A substância sinalizada com asterisco representa o padrão interno utilizado na quantificação das amostras.

Fonte: (Do autor, 2016).

Tabela 13 - Resultados otimizados dos parâmetros dependentes da fonte no espectrômetro de massas.

Gases	Pressão (psi)	Temperatura (°C)
Cad gas (CAD)	Medium	
Curtain gas (CUR)	20	650
Ion source 1 (GS1)	55	
Ion source 2 (GS2)	55	

Fonte: (Do autor, 2016).

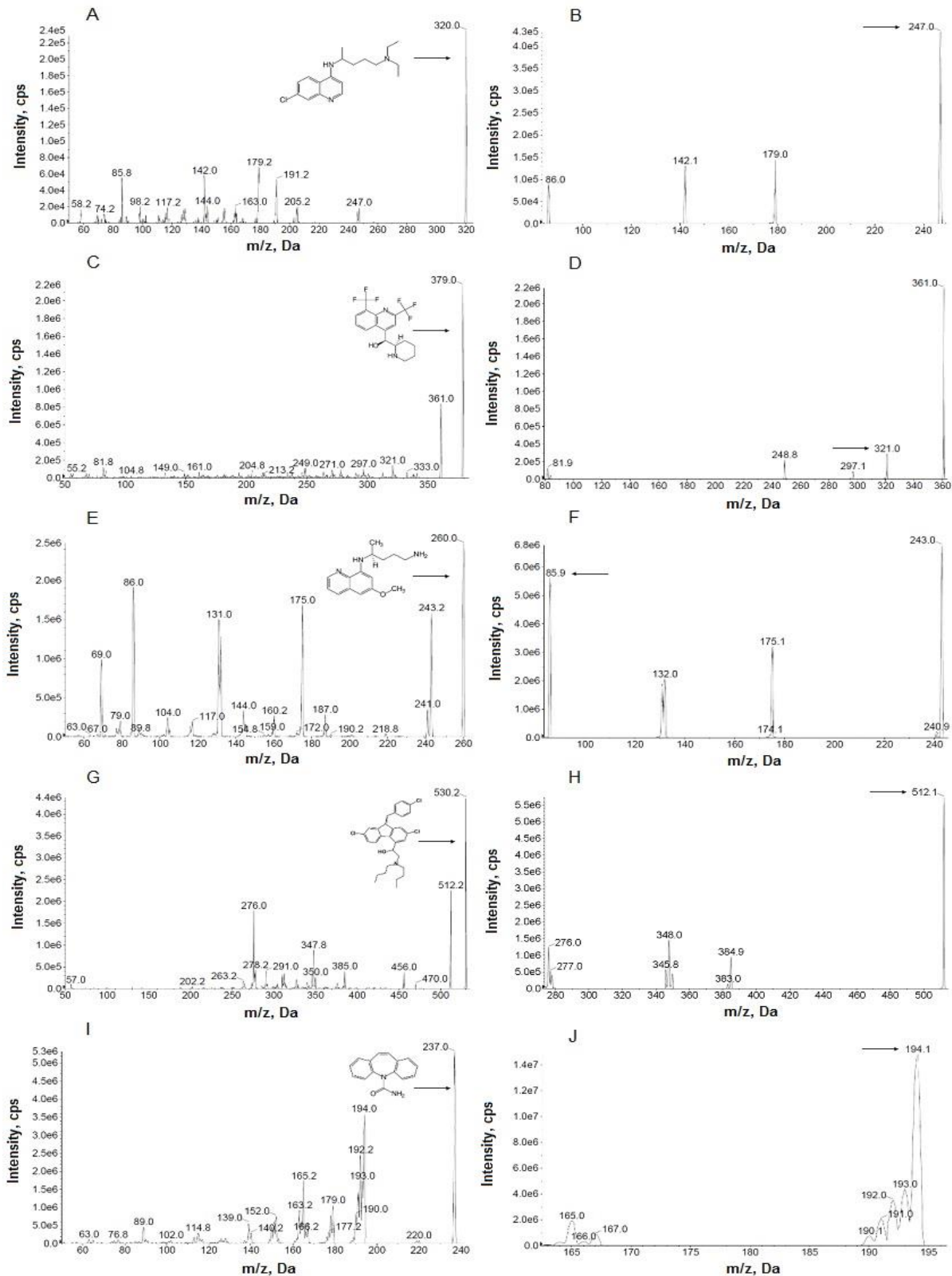


Os íons precursores obtidos para cada um dos analitos do trabalho foram: cloroquina (m/z 320,0), mefloquina (m/z 379,0), primaquina (m/z 260,0), lumefantrina (m/z 530,2) e carbamazepina (m/z 237,0). Estes resultados são consistentes com os dados presentes na literatura científica (HODEL et al, 2009; NA-BANGCHANG, 2014; SENER et al, 2007).

As substâncias de interesse identificadas foram submetidas ao processo de dissociação induzida por colisão (DIC), onde os respectivos fragmentos (íons produtos) para cada uma das substâncias foram selecionados, sendo cloroquina (m/z 247,0), mefloquina (m/z 321,0), primaquina (m/z 85,9), lumefantrina (m/z 512,1) e carbamazepina (m/z 194,1). Estes dados reproduzem os já observados na literatura científica (HODEL et al, 2009; NA-BANGCHANG, 2014; SENNER et al, 2007; AVULA et al, 2012; POLAGANI et al, 2013).

A figura 20 ilustra os espectros obtidos através da identificação das substâncias alvo do estudo pelo espectrômetro de massas (ABSCIEX, API QTRAP 5500).

Figura 20 - Espectros representativos dos íons precursor e espectros dos íons produtos da cloroquina ( $m/z$ ) (320.0>247.0) (A e B), mefloquina ( $m/z$ ) (379.0>321.0) (C e D), primaquina ( $m/z$ ) (260.0>85.9) (E e F), lumefantrina ( $m/z$ ) (530.2>512.1) (G e H) e carbamazepina ( $m/z$ ) (237.0>194.1) (I e J), respectivamente.



Nota: A setas nos espectros dos íons precursor e produtos indicam os íons monitorados através de sua massa/carga ( $m/z$ ) para seus respectivos canais de transição.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.2.2 Condições cromatográficas

A tabela 14 ilustra as condições cromatográficas finais obtidas após o desenvolvimento do método bioanalítico.

Tabela 14 - Condições cromatográficas definidas para a aquisição das substâncias.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Coluna analítica	ACE® 3 C8 3,0 µm x 4,6mm x 100,0 mm
Fase móvel (%)	Fase móvel: 25% - A e 75% - B
Fluxo (mL/min)	1,000 mL/min de 0,01 min até 2,00 min
	1,200 mL/min de 2,10 min até 4,50 min
	1,000 mL/min de 4,60 min até 5,50 min (com divisor de fluxo pós coluna 1/1)
Pressão do sistema (bar)	135 ± 5 bar para fluxo de 1,000 mL/min
	160 ± 5 bar para fluxo de 1,200 mL/min
Temperatura do forno de coluna (°C)	45 °C
Temperatura do <i>autosampler</i> (°C)	10 °C
Volume de injeção (µL)	10 µL
Tempo de corrida (min)	5,5 min
Temperatura do laboratório (°C)	22,0 ± 2 °C
Umidade relativa do ar (%)	45 ± 5 %

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.2.3 Linearidade

O intervalo de concentrações para o estudo da linearidade foi definido com base em dados farmacocinéticos presentes em artigos científicos e documentos referentes aos protocolos de tratamento contra a malária disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde e pelo Governo Federal.

A tabela 15 ilustra o intervalo de concentração definido para cada um dos analitos estudados.

Tabela 15 - Níveis de concentração para a curva de calibração de cada um dos quatro analitos monitorados.

Nível de calibração	Concentração em matriz biológica (ng/mL)			
	Cloroquina	Mefloquina	Primaquina	Lumefantrina
08	500,00	2500,00	500,00	500,00
07	400,00	2000,00	400,00	400,00
06	200,00	1000,00	200,00	200,00
05	100,00	500,00	100,00	100,00
04	50,00	100,00	10,00	10,00
03	25,00	50,00	5,00	5,00
02	10,00	25,00	2,50	2,50
01	5,00	10,00	1,00	1,00

Nota: O valor de concentração descrito para cada uma das substâncias representa sua concentração presente na matriz biológica.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.2.4 Tempos de coleta

Com base nos dados farmacocinéticos conhecidos existentes na literatura e no Guia para o Tratamento da Malária da OMS, os tempos de coleta definidos para o presente trabalho foram: 0, 3, 7, 14, 21, 28, 42 e 63 dias após a administração dos medicamentos, onde foram observadas concentrações referentes aos analitos monitorados pelo estudo.

#### 4.2.5 Procedimento de coleta e manuseio das amostras biológicas em papel filtro

Um fator limitante para a coleta de amostras em matriz biológica dos indivíduos participantes do estudo foi que a maior parte destes habitavam regiões de difícil acesso no interior do país.

Sendo assim, nos locais onde as amostras de sangue dos indivíduos foram coletadas, na Região Norte do país, foi constatado que não havia condições mínimas de se fazer a coleta de sangue total e mantê-lo conservado até o momento da análise. Os profissionais de saúde utilizaram embarcações para alcançar as regiões onde estavam os pacientes desse estudo, não possuindo a estrutura mínima

exigida para um laboratório clínico como por exemplo ultra-freezers para o acondicionamento das amostras sanguíneas. O centro bioanalítico responsável pela análise dessas amostras foi localizado no Rio de Janeiro, dessa forma o procedimento convencional de coleta de amostras em estudos clínicos se mostrou não mais apropriado para esse fim, sendo necessário a utilização de uma nova alternativa, sendo definida a coleta de sangue em papel filtro.

O sangue coletado dos indivíduos foi transferido para papel filtro em volume fixo (100  $\mu$ L). Desta maneira, os resultados foram acrescidos de consistência analítica, pois uma mesma quantidade de matriz biológica foi analisada para todos os tempos de coleta dos indivíduos e amostras de validação. Posteriormente à padronização do procedimento de coleta e manuseio das amostras em papel filtro foi realizada a coleta das amostras de pacientes em tratamento contra a malária e seu armazenamento para posterior envio ao centro bioanalítico.

Após a padronização da coleta das amostras em papel filtro descrita anteriormente na seção 3.1.1. foi necessário desenvolver um procedimento para a extração dos fármacos de interesse presentes na matriz biológica.

#### 4.2.6 Procedimento de extração das amostras em matriz biológica adsorvida em papel filtro

As amostras do estudo foram extraídas da matriz biológica de maneira a viabilizar sua detecção pelo sistema de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em modo sequencial segundo o protocolo de extração descrito a seguir.

- Em microtubo de polipropileno de 2 mL contendo 100  $\mu$ L de sangue total branco, adicionar 50  $\mu$ L de solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu$ L de solução de PI (CBZ: 2000 ng/mL).
- Adicionar 200  $\mu$ L de NaOH 1 mol/L nas amostras e agitar por 30 s.
- Transferir todo o volume para outro microtubo de 2 mL contendo 100  $\mu$ L de sangue total branco em papel filtro.
- Adicionar 1250  $\mu$ L de TBME e agitar em agitador por 10 minutos.
- Centrifugar em microcentrífuga refrigerada a 19900 g e -10 °C durante 10 minutos.

- Congelar o extrato em ultrafreezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.
- Verter o sobrenadante para outro microtubo de 2 mL e concentrar o extrato sob fluxo de  $\text{N}_2$  a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Reconstituir o resíduo com 500  $\mu\text{L}$  de solução de reconstituição:  $\text{H}_2\text{O} + \text{AcNH}_4$  40 mmol/L + AFO pH 3,50 /  $\text{MeOH} + \text{ACN} - 80:20 - \text{v/v}$  (25:75 -  $\text{v/v}$ ).
- Agitar em agitador manual por 30 segundos e transferir 400  $\mu\text{L}$  do extrato final para vial.
- Injetar 10  $\mu\text{L}$  no CLAE-EM/EM.

Todo o processo de preparo de amostra e acompanhamento das corridas analíticas de validação do método bioanalítico e de análise de pacientes foi registrado em formulários físicos e eletrônicos, assim como em log-books do laboratório bioanalítico a fim de se garantir sua rastreabilidade e segurança dos dados.

#### 4.2.7 Preparo e extração dos controles de qualidade e amostras de tempos de coleta de indivíduos submetidas ao procedimento de diluição

A diluição das amostras foi realizada através da extração da amostra a ser diluída, em concentração referente ao dobro da concentração do CQA, e de uma amostra de BPZ extraída em paralelo a extração, com ambas as amostras seguindo o método de extração desenvolvido pelo trabalho.

- Em microtubo de polipropileno de 2 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de sangue total branco, adicionar 50  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  de solução de PI (CBZ: 2000 ng/mL).
- Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 mol/L nas amostras e agitar por 30 s.
- Transferir todo o volume para outro microtubo de 2 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de sangue total branco em papel filtro.
- Adicionar 1250  $\mu\text{L}$  de TBME e agitar em agitador por 10 minutos.
- Centrifugar em microcentrífuga refrigerada a 19900 g e  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
- Congelar o extrato em ultrafreezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.
- Verter o sobrenadante para outro microtubo de 2 mL.

- Retirar 400  $\mu\text{L}$  do extrato e adicionar 400  $\mu\text{L}$  do extrato de uma amostra de BPZ
- Concentrar o extrato sob fluxo de  $\text{N}_2$  a 50  $^\circ\text{C}$ .
- Reconstituir o resíduo com 500  $\mu\text{L}$  de solução de reconstituição:  $\text{H}_2\text{O} + \text{AcNH}_4$  40 mmol/L + AFO pH 3,50 / MeOH + ACN - 80:20 - v/v (25:75 - v/v).
- Agitar em agitador manual por 30 segundos e transferir 400  $\mu\text{L}$  do extrato final para vial.
- Injetar 10  $\mu\text{L}$  no CLAE-EM/EM.

### 4.3 Validação do método bioanalítico

#### 4.3.1 Resultados da validação do método bioanalítico

Após o desenvolvimento do método bioanalítico e da otimização dos parâmetros do equipamento de espectrometria de massas, o método foi validado para os quatro fármacos propostos pelo trabalho (cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina), de maneira simultânea, segundo os parâmetros presentes na RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 (Anexo A) e pela nota técnica 04/2014 (Anexo B), publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O resultado de todos os ensaios realizados para a validação do método bioanalítico encontram-se apresentados ao longo desta seção.

#### 4.3.2 Estabilidade do analito em matriz biológica

Foram realizados testes de estabilidade das substâncias de interesse do estudo (analitos) em matriz biológica através de quatros ensaios: estabilidade após ciclos de congelamento e degelo (TEBCD); estabilidade de curta duração em condições de análise (TEBCA), estabilidade de pós-processamento (TEBPP) e estabilidade de longa duração (TEBLD). Estes ensaios reproduziram as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo.

Em um primeiro momento as amostras submetidas aos ensaios de estabilidade foram analisadas imediatamente após seu preparo, análise essa que é considerada como o tempo zero das estabilidades ou amostras recém preparadas.

Posteriormente, as amostras foram submetidas às condições específicas para cada ensaio realizado e após um determinado período de tempo, foi realizada a sua quantificação através de uma curva de calibração recém preparada.

#### *4.3.2.1 Teste de quantificação Inicial (TQI)*

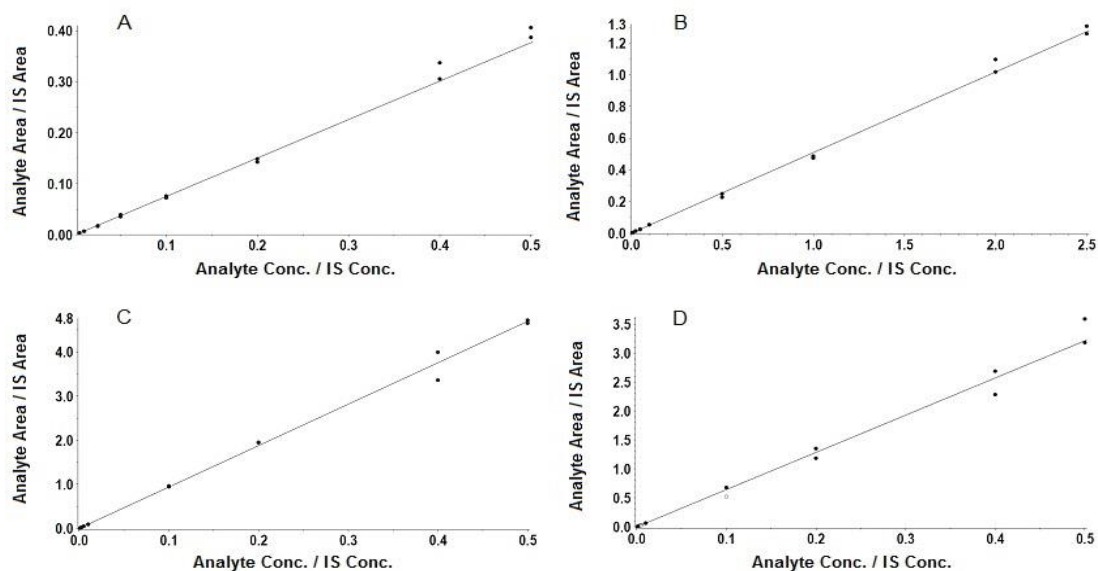
Foram preparados dois testes de quantificação inicial, o primeiro referente aos testes de estabilidade de TEBLD e TEBPP, e em um segundo momento, foi preparado um novo teste de quantificação inicial, referente as estabilidades de TEBCA e TEBCD.

No primeiro dia da validação, no teste de quantificação inicial, as soluções de trabalho e amostras recém preparadas (curva de calibração, CQB e CQA), obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 15$  % de desvio em relação ao valor nominal (mínimo de -1,72 % para o CQB da mefloquina) e máximo de 10,14 % para o CQA da cloroquina), e  $\pm 15$  % de coeficiente de variação (CV) entre as amostras de mesma concentração (mínimo de 4,14 % para o CQA da cloroquina e máximo de 9,97 % para o CQB da primaquina) para todos os analitos do trabalho.

Neste primeiro ensaio, as curvas de calibração (figura 21) referentes aos analitos cloroquina, primaquina e mefloquina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20$  % para o LIQ ou  $\pm 15$  % para as demais concentrações, enquanto que para a lumefantrina, dois pontos foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios.



Figura 21 - Curvas de calibração representativas referentes ao primeiro teste de TQI utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 16. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal das amostras, em ng/mL.

Tabela 16 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TQI utilizado para o TEBLD e TEBPP.

Substância	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	0,754	-0,000280	0,9975
Mefloquina	0,508	0,000157	0,9974
Primaquina	9,390	0,000319	0,9982
Lumefantrina	6,420	-0,000359	0,9973

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no primeiro teste de quantificação inicial.

Fonte: (Do autor, 2016).

A tabela 17 apresenta os dados obtidos após a extração e quantificação de amostras de calibração e controle de qualidade utilizadas após a preparação de amostras originadas de soluções de trabalho recentes.

Tabela 17 - Resultados obtidos na corrida analítica de TQI, utilizada para o TEBLD e TEBPP.

Substância	Controle de qualidade	Concentração nominal (ng/mL)	Média n=8 (ng/mL)	CV (%)	Desvio (%)
Cloroquina	CQB	10,00	11,01	8,47	10,14
	CQA	400,00	411,11	4,14	2,78
Mefloquina	CQB	25,00	26,09	6,48	4,38
	CQA	2000,00	1965,62	4,76	-1,72
Primaquina	CQB	2,50	2,60	9,97	4,11
	CQA	400,00	390,42	8,60	-2,40
Lumefantrina	CQB	2,50	2,60	7,88	4,06
	CQA	400,00	373,59	7,73	-6,60

Resultados referentes ao primeiro teste de quantificação inicial, para os controles de qualidade referente a baixa e alta concentração para os quatro analitos do estudo. Todas as substâncias foram aprovadas por apresentar coeficiente de variação e desvio em relação ao valor nominal entre  $\pm 15$  %.

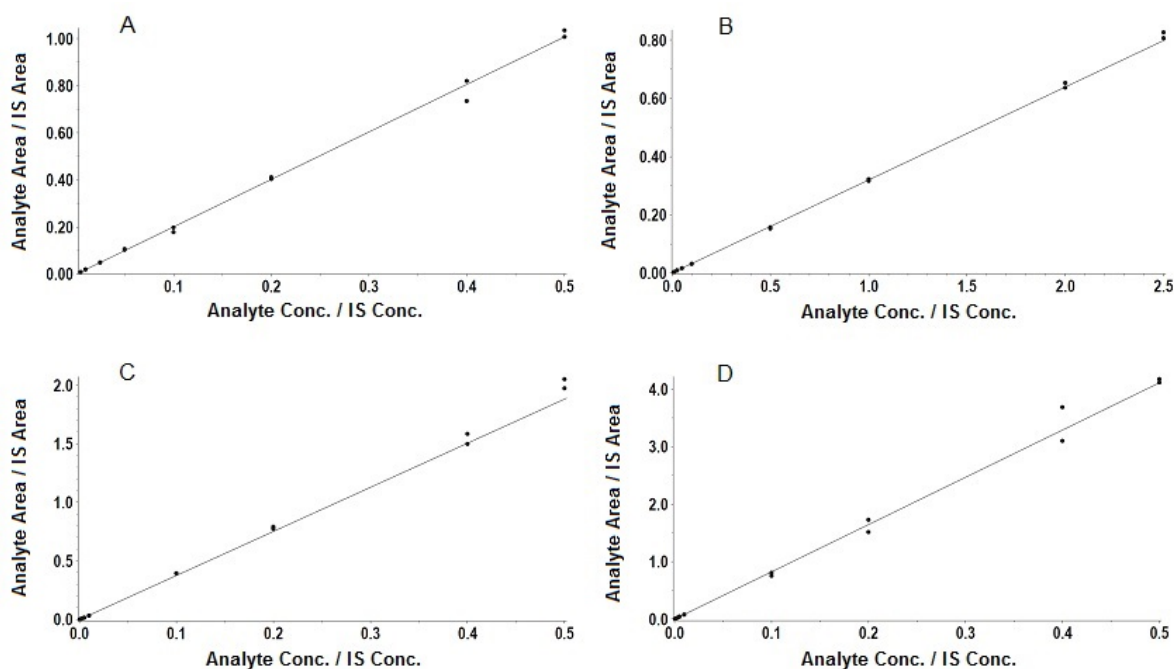
Fonte: (Do autor, 2016).

A partir deste ensaio de TQI foram aliqüotados, através de fortificação dos controles de qualidade (CQB e CQA) utilizados para o ensaio de quantificação inicial, e armazenado em freezer  $-25$  °C o teste de estabilidade em matriz biológica de longa duração (TEBLD). Os controles de qualidade (CQA e CQB) analisados foram mantidos no auto-injetor, sob a temperatura de  $10$ °C, onde foram utilizados no teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP).

No segundo ensaio de quantificação inicial, com soluções de trabalho e amostras recém preparadas (curva de calibração, CQB e CQA), todos os quatro analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 15$  % de desvio em relação ao valor nominal (mínimo de  $-0,17$  % para o CQB da cloroquina e máximo de  $10,43$  % para o CQB da lumefantrina) e  $\pm 15$  % de CV entre as amostras de mesma concentração (mínimo de  $1,89$  % para o CQB da cloroquina e máximo de  $6,31$  % para o CQA da primaquina).

As curvas de calibração do segundo TQI (figura 22) referentes aos analitos cloroquina, mefloquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20\%$  para o LIQ ou  $\pm 15\%$  para as demais concentrações, enquanto que para a primaquina, um ponto foi excluído por não se enquadrar nestes critérios.

Figura 22 - Curvas de calibração representativas referentes ao segundo teste de TQI utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 18. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal das amostras, em ng/mL.

Tabela 18 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TQI utilizado para o TEBCA e TEBCD.

Substância	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )
Cloroquina	2,020	-0,001680	0,9984
Mefloquina	0,317	0,000460	0,9990
Primaquina	3,820	0,003360	0,9978
Lumefantrina	8,190	-0,000910	0,9966

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no segundo teste de quantificação inicial.

Fonte: (Do autor, 2016).

A tabela 19 apresenta os dados obtidos após a extração e quantificação de amostras de calibração e controle de qualidades utilizadas após a preparação de amostras originadas de soluções de trabalho recentes.

Tabela 19 - Resultados obtidos na corrida analítica de TQI utilizada para o TEBCA e TEBCD.

Substância	Controle de qualidade	Concentração nominal (ng/mL)	Média n=8 (ng/mL)	CV (%)	Desvio (%)
Cloroquina	CQB	10,00	9,98	1,89	-0,17
	CQA	400,00	389,57	2,65	-2,61
Mefloquina	CQB	25,00	23,86	5,76	-4,56
	CQA	2000,00	1923,68	3,61	-3,82
Primaquina	CQB	2,50	2,59	2,94	3,43
	CQA	400,00	396,95	6,31	-0,76
Lumefantrina	CQB	2,50	2,76	5,41	10,43
	CQA	400,00	417,81	5,52	4,45

Resultados referentes ao segundo teste de quantificação inicial, para os controles de qualidade referente a baixa e alta concentração para ambos os quatro analitos do estudo. Todas as substâncias foram aprovadas por apresentar coeficiente de variação e desvio em relação ao valor nominal entre  $\pm 15\%$ .

Fonte: (Do autor, 2016).

A partir deste ensaio de TQI foram aliquotados, através de fortificação dos controles de qualidade (CQB e CQA) utilizados para o ensaio de quantificação inicial, e submetidos à exposição sobre a bancada à temperatura de + 22,5 °C o

teste de estabilidade em matriz biológica de curta duração sob condições de análise (TEBCA). Uma vez que este ensaio de TQI foi aprovado, foram armazenados em freezer a -25 °C os controles de qualidade (CQA e CQB) submetidos ao teste de estabilidade sob ciclos de congelamento e descongelamento (TEBCD).

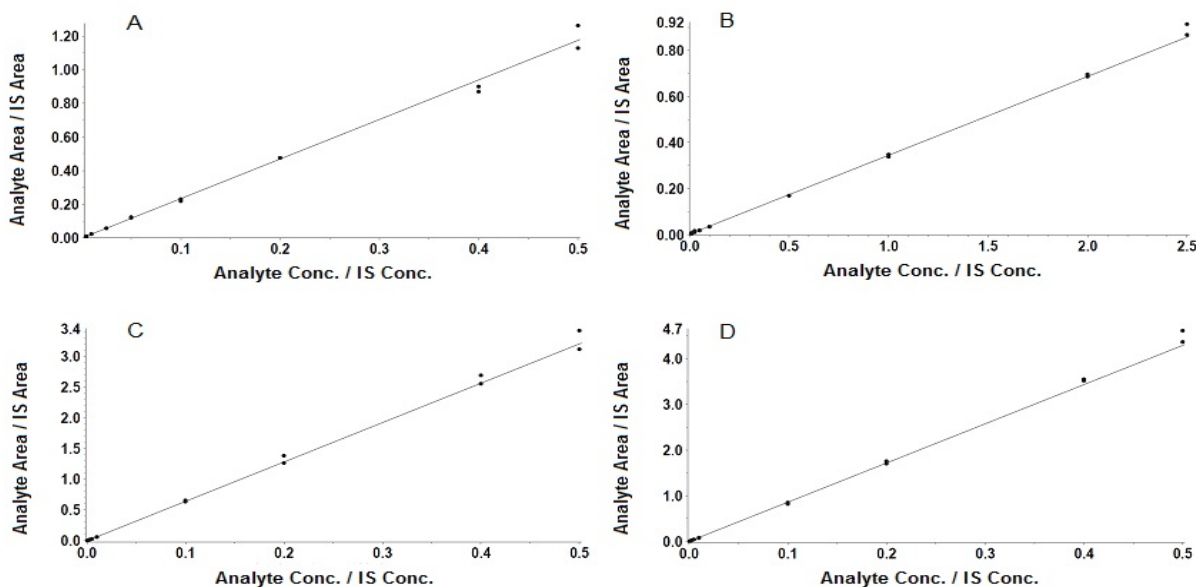
#### *4.3.2.2 Teste de estabilidade em condições de análise (TEBCA)*

A partir do segundo teste de quantificação inicial aprovado foi demonstrada a estabilidade no analito na matriz biológica sob as condições de análise a que as amostras em estudo foram submetidas.

As amostras biológicas contendo os analitos do estudo (CQB e CQA) foram consideradas estáveis após serem submetidas a exposição sobre a bancada por 27 horas e 33 minutos, a uma temperatura de + 22,5 °C e quantificadas a partir de uma curva de calibração recém preparada, uma vez que todos os analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 15$  % de desvio em relação ao valor nominal (mínimo de 1,05 % para o CQB da cloroquina e máximo de 8,62 % para o CQA da lumefantrina) e  $\pm 15$  % de CV entre as amostras de mesma concentração (mínimo de 2,76 % para o CQA da lumefantrina e máximo de 10,20 % para o CQB da lumefantrina).

As curvas de calibração (Figura 23) referentes aos analitos cloroquina, primaquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20$  % para o LIQ ou  $\pm 15$  % para as demais concentrações, enquanto que para a mefloquina, dois pontos foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios.

Figura 23 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade sob condições de análise, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 20. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal das amostras, em ng/mL.

Tabela 20 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBCA.

Substância	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	2,350	-0,001540	0,9986
Mefloquina	0,344	0,000756	0,9994
Primaquina	6,410	-0,005440	0,9979
Lumefantrina	8,560	-0,001480	0,9983

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no teste de estabilidade sob condições de análise.

Fonte: (Do autor, 2016).

A tabela 23 apresenta os dados obtidos de amostras de controles de qualidade referentes à baixa e alta concentração, extraídos após serem submetidos à temperatura ambiente (condições de análise) por 27 horas e 33 minutos a 22,5 °C

e quantificados por uma curva de calibração recém preparada. Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 36 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

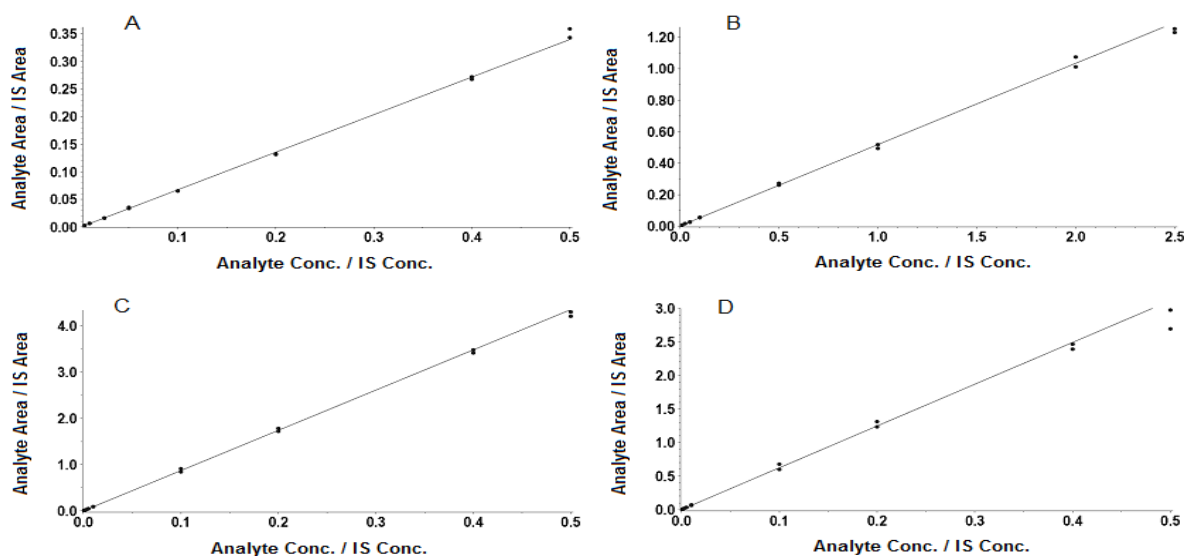
#### 4.3.2.3 Teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP)

Como cumprimento mínimo da legislação referente aos testes de estabilidade, foi avaliada a estabilidade das amostras de CQB e CQA para os analitos do estudo, após serem processadas (extraídas) no primeiro teste de quantificação inicial e armazenadas no auto-injetor do equipamento utilizado para análise.

As amostras foram consideradas estáveis por um período de 44 horas e 20 minutos após o preparo, com quantificação a partir de uma curva de calibração recém preparada, uma vez que todos os analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 15\%$  de desvio em relação ao valor nominal (mínimo de  $-1,80\%$  para o CQA da primaquina e máximo de  $7,31\%$  para o CQA da lumefantrina) e  $\pm 15\%$  de CV entre as amostras de mesma concentração (mínimo de  $1,34\%$  para o CQA da primaquina e máximo de  $8,08\%$  para o CQB da lumefantrina).

As curvas de calibração (Figura 24) referentes aos analitos cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20\%$  para o LIQ ou  $\pm 15\%$  para as demais concentrações.

Figura 24 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade de pós processamento, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 21. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal das amostras, em ng/mL.

Tabela 21 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBPP.

Substância	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	0,681	-0,000601	0,9990
Mefloquina	0,516	0,001720	0,9966
Primaquina	8,710	-0,000438	0,9994
Lumefantrina	6,230	0,000691	0,9974

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no teste de estabilidade de pós processamento.

Fonte: (Do autor, 2016).

A tabela 23 apresenta os dados obtidos de amostras de controles de qualidade referentes à baixa e alta concentração, quantificadas após serem submetidas à temperatura de armazenamento em auto injetor (condições de análise) por 44 horas e 20 minutos a 10 °C por uma curva de calibração recém preparada. Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 36 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

#### 4.3.2.4 Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e degelo (TEBCD)

As amostras dos pacientes em estudo foram coletadas e armazenadas na temperatura de armazenamento de - 25 °C em freezer, que foi reproduzida durante a avaliação da estabilidade. Além deste parâmetro, os analitos em matriz biológica devem suportar ciclos de descongelamento e congelamento sem que haja degradação das mesmas, uma vez que é necessário que as amostras mantenham sua integridade durante o armazenamento e manuseio de preparo.

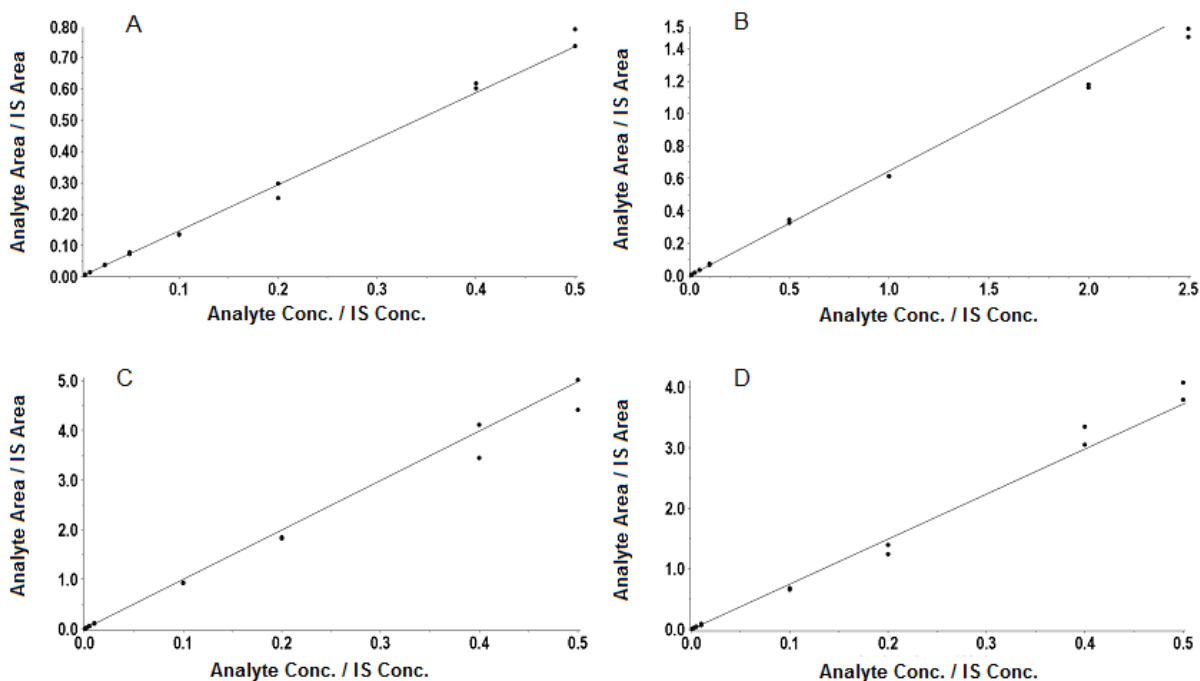
As amostras de CQB e CQA, armazenadas em freezer a - 25 °C, contendo os quatro analitos do estudo foram consideradas estáveis após quatro ciclos de descongelamento e congelamento realizados de maneira periódica e pelo tempo



total de armazenamento por 260 horas e 52 minutos, após serem descongeladas ao final do quarto ciclo, extraídas e quantificadas a partir de uma curva de calibração recém preparada, uma vez que todos os analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 15\%$  de desvio em relação ao valor nominal (mínimo de  $-0,93\%$  para o CQA da cloroquina e máximo de  $9,64\%$  para o CQA da lumefantrina) e  $\pm 15\%$  de CV entre as amostras de mesma concentração (mínimo de  $3,27\%$  para o CQB da cloroquina e máximo de  $7,99\%$  para o CQB da lumefantrina).

As curvas de calibração (figura 25) referentes aos analitos cloroquina e mefloquina não possuíam pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20\%$  para o LIQ ou  $\pm 15\%$  para as demais concentrações, enquanto que para a lumefantrina e para a primaquina, dois pontos e três pontos da curva de calibração foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios, respectivamente.

Figura 25 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 22. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal das amostras, em ng/mL.

Tabela 22 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TEBCD.

Substância	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	1,470	-0,000267	0,9974
Mefloquina	0,645	0,000911	0,9959
Primaquina	9,590	0,000785	0,9967
Lumefantrina	7,570	0,001040	0,9947

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no teste de estabilidade após ciclos de congelamento e degelo.

Fonte: (Do autor, 2016).

A tabela 23 apresenta os dados obtidos de amostras de controles de qualidade referentes à baixa e alta concentração, quantificadas após serem submetidas a quatro ciclos de congelamento e descongelamento, sob temperatura de armazenamento das amostras a  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  pelo tempo total de 260 horas e 52 minutos, por uma curva de calibração recém preparada. Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 37 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

Tabela 23 - Resultados do teste de estabilidade dos analitos do estudo em matriz biológica.

Analito	Conc. Nominal (ng/mL)	Condições de análise			Pós processamento			Congelamento e degelo		
		Média (ng/mL)	CV (%)	Desv (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Desv (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Desv (%)
Cloroquina	10,00	10,11	3,27	1,05	10,57	8,37	5,66	9,05	3,27	-9,50
	400,00	392,86	2,67	-1,79	418,35	3,34	4,59	396,29	5,62	-0,93
Mefloquina	25,00	23,12	9,25	-7,50	25,87	6,71	3,48	23,13	4,89	-7,47
	2000,00	1946,53	3,34	-2,67	2070,68	6,04	3,53	1819,39	3,30	-9,03
Primaquina	2,50	2,66	2,77	6,37	2,46	1,74	-1,80	2,46	3,70	-1,42
	400,00	421,78	3,25	5,44	407,30	1,34	1,83	416,77	4,45	4,19
Lumefantrina	2,50	2,70	10,20	8,04	2,39	8,08	-4,41	2,28	7,99	-8,65
	400,00	434,50	2,76	8,62	429,23	6,76	7,31	438,54	5,34	9,64

Resultados referentes ao teste de estabilidade sob condições de análise (TEBCA), teste de estabilidade de pós processamento (TEBPP) e teste de estabilidade de ciclos de congelamento e degelo (TEBCD), para os controles de qualidade referente a baixa e alta concentração para ambos os quatro analitos do estudo. Todos os analitos foram aprovados por apresentar coeficiente de variação e desvio em relação ao valor nominal entre  $\pm 15\%$ .

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.2.5 Teste de estabilidade de longa duração (TEBLD)

Como fase final da estabilidade dos analitos em matriz biológica, o teste de estabilidade de longa duração foi realizado a partir do armazenamento sob as mesmas condições (temperatura e tempo de armazenamento) onde foram armazenadas as amostras do estudo (tempos de coleta dos indivíduos) e amostras de controle de qualidade de concentração baixa e alta da mesma origem dos que foram aprovados pelo teste de quantificação inicial e sua posterior análise através de uma curva de calibração recém preparada.

Segundo o artigo 39 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA, o período de tempo considerado neste teste de estabilidade deverá ser igual ou maior que o período compreendido entre a coleta da primeira amostra em matriz biológica de um paciente participante da pesquisa pela etapa clínica e a análise da última amostra de paciente participante da pesquisa pela etapa analítica.

Foram preparadas amostras de CQB e CQA a partir da mesma origem das amostras dos controles de qualidade fortificados com as soluções recém-preparadas

e aprovadas no primeiro teste de quantificação inicial e submetidas ao armazenamento por uma temperatura média de - 25 °C.

Até o momento do término deste trabalho, o período compreendido entre a data da primeira coleta do primeiro paciente em tratamento contra malária e a data da última amostra de paciente analisada pela central analítica (período total de armazenamento das amostras biológicas) era inferior ao período de armazenamento em freezer a - 25 °C das amostras de CQB e CQA dos analitos, considerando seu início realizado na data do primeiro teste de quantificação inicial. Sendo assim, o teste de estabilidade de longa duração ainda não foi realizado.

#### 4.3.3 Estabilidade do analito em solução

Além da estabilidade dos analitos na matriz biológica destinada à realização do estudo, também foi realizada a estabilidade dos mesmos em solução e do padrão interno, para garantir a integridade das soluções de trabalho utilizadas no período de tempo referente ao preparo das amostras e corridas analíticas.

O teste de estabilidade em soluções de trabalho foi realizado comparando as médias das áreas de oito amostras originadas da solução de trabalho de maior concentração e menor concentração dos analitos, assim como para o padrão interno, submetidos ao período de estabilidade, com a média das áreas de oito amostras de soluções de trabalho recém preparadas ao final do período de tempo estipulado pela estabilidade, contendo concentrações equivalentes às soluções de trabalho preparadas anteriormente, que foram submetidas às condições do teste de estabilidade.

A estabilidade foi comprovada ao não se observar desvio superior a 10 % entre as respostas das áreas entre as soluções submetidas ao teste de estabilidade quando comparadas com as soluções recém preparadas. Todas as áreas foram incluídas no cálculo, uma vez que a exclusão de valores de áreas discrepantes não é permitida.

#### *4.3.3.1 Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise (TEBSCA)*

Os analitos e o padrão interno em solução foram considerados estáveis após serem submetidos à exposição sobre a bancada por 50 horas e 50 minutos, a uma temperatura de + 22,5°C, uma vez que todos os analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 10$  % de desvio em relação às soluções recém preparadas (mínimo de -0,29 % para a solução de trabalho de uso da carbamazepina e máximo de -4,62 % para a solução estoque da mefloquina).

A tabela 24 apresenta os dados obtidos de amostras originadas da diluição das soluções de trabalho preparadas, referentes à mais baixa concentração e à mais alta concentração para cada um dos quatro analitos do estudo e do padrão interno, após serem submetidos à temperatura ambiente (condições de análise) por 50 horas e 50 minutos a 22,5 °C. Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 42 da resolução RDC 27/2012 da ANVISA.

#### *4.3.3.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA)*

A estabilidade dos analitos e do padrão interno em solução também foi avaliada quanto ao seu armazenamento nas condições do estudo (temperatura) e tempo de armazenagem.

Soluções de trabalho contendo os quatro analitos (soluções estoque e solução de trabalho referente ao LIQ) e o padrão interno (solução estoque e solução de trabalho de uso diário) foram preparadas e armazenadas em freezer na temperatura de - 25 °C, iniciando assim o período de estabilidade de armazenamento. O término do período de estabilidade foi considerado quando as soluções de trabalho foram retiradas do freezer e comparadas com soluções recém preparadas, contendo as mesmas concentrações das soluções submetidas ao teste de estabilidade.

Foram comparadas as médias das áreas de oito amostras originadas da solução de trabalho de maior concentração e menor concentração para os analitos, assim como para o padrão interno, submetidos ao período de estabilidade, com a média das áreas de oito amostras de soluções de trabalho recém preparadas ao final do período de tempo estipulado pela estabilidade

Os analitos em solução foram considerados estáveis após serem submetidas ao armazenamento em freezer a - 25 °C por 3327 horas e 45 minutos, uma vez que todos os analitos obedeceram ao critério de estarem entre  $\pm 10$  % de desvio em relação as soluções recém preparadas (mínimo de 0,05 % para a solução de trabalho referente ao LIQ para a lumefantrina e máximo de -6,50 % para a solução de trabalho referente ao LIQ para a mefloquina).

A tabela 24 apresenta os dados obtidos de amostras originadas da diluição das soluções de trabalho preparadas, referentes à mais baixa concentração e à mais alta concentração para cada um dos quatro analitos do estudo e do padrão interno, após serem submetidas à temperatura de armazenamento de - 25 °C pelo tempo total de 3327 horas e 45 minutos. Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 42 da resolução RDC 27/2012 da ANVISA.

Tabela 24 - Resultados do teste de estabilidade dos analitos do estudo e do padrão interno em solução.

Substância	Concentração da solução (ng/mL)	Condições de análise					Armazenamento				
		Estabilidade		Recente		Desvio (%)	Estabilidade		Recente		Desvio (%)
		Média (Área)	CV (%)	Média (Área)	CV (%)		Média (Área)	CV (%)	Média (Área)	CV (%)	
Cloroquina	10	8094,90	5,64	7945,73	5,84	1,88	52945,99	2,46	53139,55	2,45	-0,36
	1000000	739557,03	2,48	759494,97	1,44	-2,63	5449860,53	1,74	5497623,06	2,28	-0,87
Mefloquina	20	16410,73	5,41	17183,29	9,19	-4,50	24272,27	5,83	25959,96	6,67	-6,50
	1000000	3065496,00	2,90	3214129,66	2,97	-4,62	4642424,91	2,01	4660092,08	3,21	-0,38
Primaquina	2	42370,26	1,43	41755,64	2,59	1,47	39774,74	2,30	39034,53	3,22	1,90
	1000000	13928366,30	1,57	14063853,98	1,18	-0,96	15561740,56	2,08	15794285,31	1,56	-1,47
Lumefantrina	2	33544,56	1,70	35017,08	2,64	-4,21	80647,72	2,91	80607,71	2,76	0,05
	1000000	12726210,07	1,22	13018404,81	1,97	-2,24	27902859,97	1,86	28359243,34	1,86	-1,61
Carbamazepina	2000	2838840,35	2,26	2847200,28	2,71	-0,29	1036809,84	2,72	1020489,83	2,25	1,60
	1000000	16685848,71	1,89	16990444,46	0,46	-1,79	6728250,89	4,34	6788526,21	2,19	-0,89

Resultados referentes ao teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise (TEBSCA) e teste de estabilidade das soluções de trabalho armazenadas (TEBSTA), para as soluções referentes a baixa e alta concentração para ambos os quatro analitos do estudo e do padrão interno. Todas as substâncias foram aprovadas por apresentar desvio em relação as soluções recém preparadas no limite de  $\pm 10$  %.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.4 Teste de seletividade (TSE)

A metodologia utilizada para a extração e quantificação das substâncias de interesse foi avaliada em relação à presença de interferentes na região próxima ao tempo de retenção do analito e/ou metabólito quantificável e de seu padrão interno, através da comparação dos fragmentogramas dos íons produtos obtidos nos canais de transição ( $m/z$ ) monitorados pelo estudo.

Esta avaliação foi realizada através do preparo de amostras de branco de matriz biológica de seis fontes distintas e de uma amostra referente ao limite inferior de quantificação (LIQ) para cada um dos quatro analitos e para a concentração de uso do padrão interno.

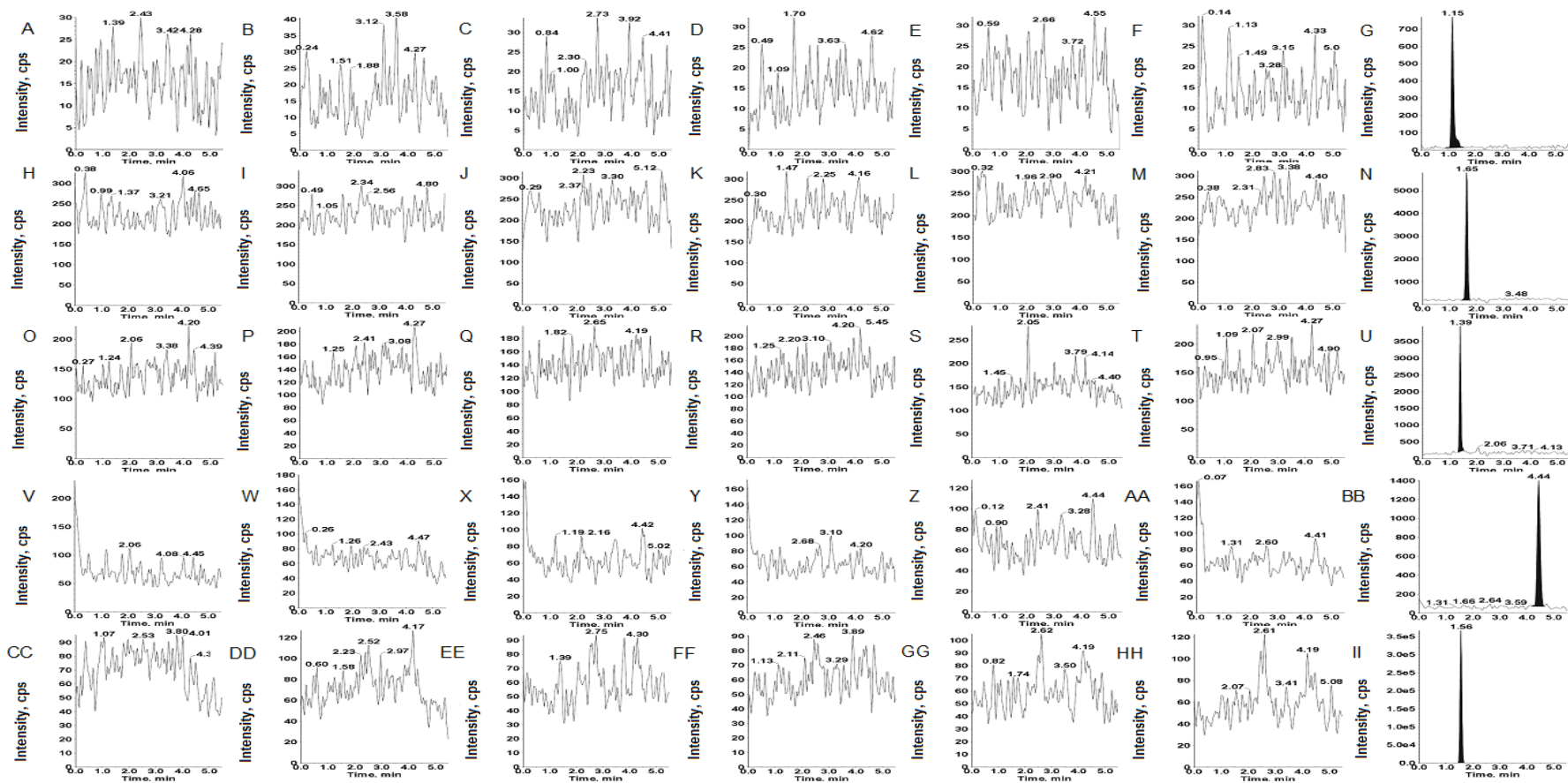
Segundo a legislação utilizada no presente trabalho, uma vez que foi utilizado sangue total como matriz biológica do estudo, a seletividade foi realizada com o preparo de amostras de branco de sangue (matriz com ausência de analito e padrão interno) de cinco fontes distintas de matriz considerada normal e de uma amostra de origem lipêmica. Estas amostras de branco de matriz foram comparadas com uma amostra de LIQ extraída com uma das bolsas de sangue total normal utilizadas para as amostras branco, onde não foi observada a presença de picos na região próxima ao tempo de retenção acima de 20 % da resposta do LIQ para cada analito e 5 % para o padrão interno.

A figura 26 apresenta o resultado do teste de seletividade para os quatro analitos do estudo, cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina, e para o padrão interno carbamazepina, em suas amostras de cinco brancos de matriz biológica normais de fontes distintas e um branco de matriz biológica lipêmica

Não foram observados interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos superiores a 20 % da área de sua amostra de LIQ correspondente e 5 % da amostra de padrão interno.



Figura 26 - Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de seletividade.



Nota: amostra de branco lipêmico, para a cloroquina (A), mefloquina (H), primaquina (O), lumefantrina (V) e carbamazepina (CC), as amostras de branco normais para a cloroquina (B a F), mefloquina (I a M), primaquina (P a T), lumefantrina (W a AA) e carbamazepina (DD a HH) e a amostra do limite inferior de quantificação comparativa para a cloroquina (G), mefloquina (N), primaquina (U), lumefantrina (BB) e a concentração de uso do padrão interno carbamazepina (II). Não foi observado contaminação acima de 20 % da área do limite inferior de quantificação para os analitos e 5 % da área do padrão interno.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.5 Teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes (TSEFC)

Além da avaliação da metodologia em relação a possíveis interferentes nas matrizes biológicas utilizadas no estudo, foi necessário também avaliar a possível interferência de fármacos/metabólitos e substâncias possivelmente interferentes, provenientes de administração concomitante de medicamentos ao período de administração das substâncias de interesse do estudo.

O ensaio foi realizado adicionando no momento da extração uma solução contendo todas as substâncias utilizadas durante o período de administração e coleta das amostras do estudo, como é orientado na nota técnica 04/2014 (Anexo B), em adendo ao artigo 7º da resolução RDC N° 27 de 17 de maio de 2012 (Anexo A).

De acordo com a presente nota técnica, uma vez que foi utilizado sangue total como matriz biológica do estudo, devem ser analisadas seis amostras de fontes distintas, sendo cinco normais e uma lipêmica, devendo possuir o mesmo anticoagulante utilizado na análise dos analitos empregados no trabalho.

Foi realizado o teste de seletividade contendo apenas as substâncias interferentes, nicotina e cafeína, adicionadas no momento do processamento da amostra, uma vez que o presente trabalho utilizou pacientes sem acompanhamento clínico diário, e em tratamento contra a malária. Sendo assim, seria de enorme dificuldade além de ser extremamente custoso, reunir todos os padrões analíticos referentes aos possíveis medicamentos utilizados de maneira concomitante durante o procedimento de administração e coleta das amostras de interesse do estudo.

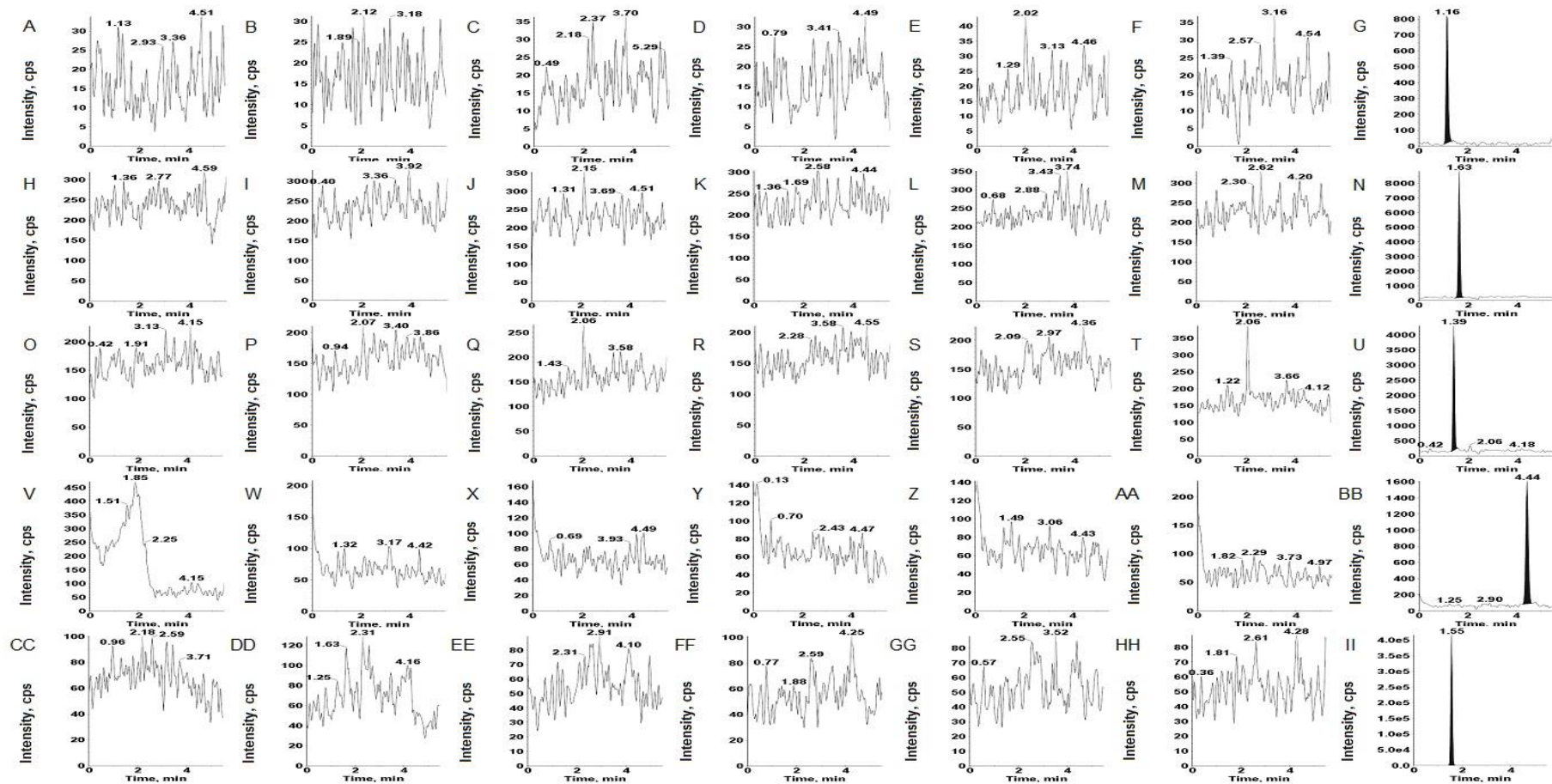
Não foram observados picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos e do padrão interno nas amostras de branco analisadas do presente estudo e contendo as substâncias possivelmente interferentes cafeína e nicotina, adicionadas durante a extração das amostras, acima de 20 % da resposta do LIQ para cada analito e 5 % para o padrão interno.

A figura 27 apresenta o resultado do teste de seletividade para os quatro analitos do estudo, cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina, e para a concentração de uso do padrão interno carbamazepina, em suas amostras de cinco brancos de matriz biológica normais de fontes distintas e um branco de matriz

biológica lipêmica, adicionadas de solução de trabalho contendo as substâncias possivelmente interferentes cafeína e nicotina no momento da extração.

Não foram observados interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos superiores a 20 % da área de sua amostra de LIQ correspondente e 5 % da amostra de padrão interno.

Figura 27 - Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de seletividade contendo fármacos concomitantes/interferentes.



Nota: amostra de branco lipêmico, para a cloroquina (A), mefloquina (H), primaquina (O), lumefantrina (V) e carbamazepina (CC), as amostras de branco normais para a cloroquina (B a F), mefloquina (I a M), primaquina (P a T), lumefantrina (W a AA) e carbamazepina (DD a HH) e a amostra do limite inferior de quantificação comparativa para a cloroquina (G), mefloquina (N), primaquina (U), lumefantrina (BB) e a concentração de uso do padrão interno carbamazepina (II). Não foi observado contaminação acima de 20 % da área do limite inferior de quantificação para os analitos e 5 % da área do padrão interno.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.6 Teste de efeito de matriz (TEM)

O procedimento de extração pode proporcionar para as substâncias de interesse do estudo algumas características que podem influenciar no comportamento das amostras extraídas. Essas condições normalmente se originam na interação da substância (analito) com a matriz biológica utilizada.

A metodologia foi desenvolvida de maneira a minimizar quaisquer efeitos que pudessem comprometer a qualidade dos resultados, bem como o procedimento de extração.

O teste de efeito de matriz, também chamado de fator matriz normalizado pelo padrão interno, avalia a possível interferência das substâncias com a matriz biológica originada de vários indivíduos e o quanto o padrão interno é capaz de interagir com o meio de extração de maneira semelhante ao analitos do estudo, originando uma resposta de maneira a produzir uma razão equivalente entre as amostras de mesma concentração e proporcional para as diversas concentrações utilizadas no estudo.

Seguindo as orientações propostas na legislação em vigor, o ensaio foi realizado a partir da extração de seis amostras referentes ao CQB e CQA, originadas a partir de matrizes biológicas de fontes distintas, duas de origem lipêmica e quatro de origem normal. Estas amostras foram comparadas com amostras preparadas contendo solução de diluição como substituta da matriz biológica nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA extraídas nas matrizes biológicas do estudo.

O critério de avaliação utilizado foi que a aprovação do teste de efeito de matriz estaria vinculada ao coeficiente de variação (CV) de todos os fatores matriz normalizados entre as amostras de solução e em sangue total não superior a 15 %.

O ensaio foi considerado de acordo com os parâmetros presentes na legislação em vigor para os quatro analitos do trabalho, uma vez que o menor coeficiente de variação (CV) observado pelo FMN foi de 6,50 % para a primaquina e o maior de 14,88 % para a lumefantrina.

A tabela 25 apresenta os dados obtidos de amostras originadas da comparação entre o fator matriz normalizado pelo padrão interno referentes às amostras de controle de qualidade de baixa e alta concentração extraídas em matriz biológica e às amostras de controle de qualidade de baixa e alta concentração

extraídas em solução de diluição como matriz substituta à matriz biológica do estudo.

Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 18 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

#### 4.3.7 Teste de efeito de matriz contendo fármacos concomitantes/interferentes (TEMFC)

Juntamente com o ensaio para a avaliação de possível interferência da matriz nas análises foi necessário a avaliação das amostras em relação a não apresentarem alterações significativas que interfiram na interação com a matriz biológica, mesmo na presença de fármacos concomitantes ou substâncias interferentes.

Durante o preparo foram adicionados nas amostras de CQB e CQA em matriz biológica, além do analito e do padrão interno, uma solução contendo substâncias de uso concomitante ao estudo.

Assim como no ensaio de seletividade contendo fármacos concomitantes e/ou substâncias interferentes, este ensaio também foi realizado contendo apenas cafeína e nicotina adicionadas na amostra durante a extração, uma vez que o estudo foi conduzido com pacientes sem acompanhamento clínico diário e em tratamento contra a malária, sendo de difícil controle a utilização de outras substâncias administradas concomitantemente ao período do estudo.

O ensaio foi considerado de acordo com os parâmetros presentes na legislação em vigor para os quatro analitos do trabalho uma vez que o menor coeficiente de variação (CV) observado pelo FMN foi de 1,02 % para a primaquina e o maior de 14,78 % para a lumefantrina.

Todos os dados obtidos de amostras originadas da comparação entre o fator matriz normalizado pelo padrão interno referentes a amostras de controle de qualidade de baixa e alta concentração extraídas em matriz biológica e amostras de controle de qualidade de baixa e alta concentração extraídas em solução de diluição como matriz substituta a matriz biológica do estudo, adicionadas de solução de trabalho contendo as substâncias interferentes no momento da extração estão apresentados na tabela 25.

Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 18 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

Tabela 25 - Resultados do teste de fator matriz normalizado pelo padrão interno, na ausência e presença de fármacos concomitantes/interferentes para as substâncias do estudo.

Analito	Conc. Nominal (ng/mL)	TEM		TEMFC	
		Média do FMN	CV (%)	Média do FMN	CV (%)
Cloroquina	10	0,98	7,61	1,00	11,78
	400				
Mefloquina	25	0,94	13,90	0,95	9,76
	2000				
Primaquina	2,5	0,96	6,50	1,02	1,02
	400				
Lumefantrina	2,5	0,99	14,88	0,99	14,78
	400				

Resultados referentes ao teste de fator matriz normalizado pelo padrão interno, na ausência (TEM) e presença de fármacos concomitantes/interferentes (TEMFC) para os analitos do estudo referente a amostras de controles de qualidade de baixa e alta concentração para ambos os quatro analitos do estudo. Todas os analitos foram aprovadas por apresentar desvio padrão relativo entre as médias do fator matriz normalizado pelo padrão interno no limite de  $\pm 15\%$ .

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.8 Teste de efeito residual (TER)

O sistema analítico foi avaliado quanto à sua estabilidade em proporcionar a injeção e aquisição de um número elevado de amostras biológicas sem que o procedimento de análise adquira contaminação/interferência externa nas amostras do estudo, uma vez que a observação deste fenômeno pode reduzir a confiabilidade dos resultados obtidos durante a aquisição das amostras do estudo.

O sucesso deste ensaio demonstra a eficiência do sistema de lavagem do auto-injetor no local da porta e agulha de injeção, visto que a própria agulha de injeção poderia se tornar uma fonte de contaminação externa durante a análise no método bioanalítico.

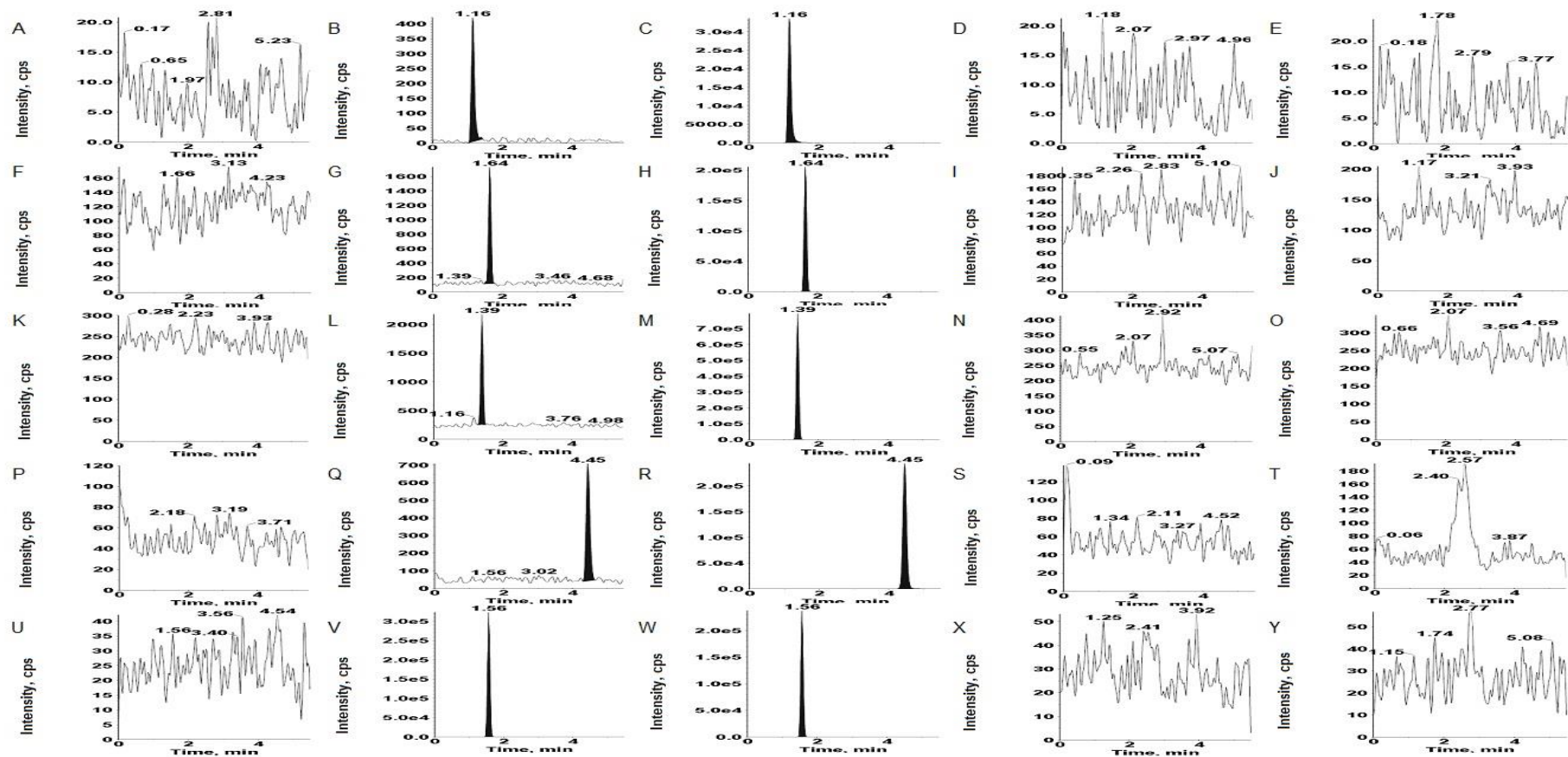
Assim como descrito na legislação em vigor, o teste foi considerado aprovado, uma vez que não foram observados picos cromatográficos com resposta maior do que 20 % das áreas dos analitos e maior do que 5 % da área do padrão interno.

A figura 28 representa o resultado do teste de efeito residual, realizado para os quatro analitos do estudo (cloroquina, mefloquina, primaquina e lumefantrina) e para o padrão interno (carbamazepina), onde se observa a injeção da amostra branco de matriz isenta de analitos, seguida da injeção da amostra referente ao limite inferior de quantificação, a amostra referente ao limite superior de quantificação e a reinjeção da amostra branco por duas vezes após a injeção da amostra do limite inferior de quantificação.

Todas as amostras foram aprovadas segundo o artigo 14 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA, uma vez que não foi observada contaminação superior a 20 % da área do LIQ, próximas aos tempos de retenção dos analitos e acima de 5 % próximas ao tempo de retenção do padrão interno.



Figura 28 - Cromatogramas representativos dos íons monitorados para os analitos e para o padrão interno referentes ao teste de efeito residual.



Nota: amostra de branco, para a cloroquina (A), mefloquina (F), primaquina (K), lumefantrina (P) e carbamazepina (U), as amostras do limite inferior de quantificação para a cloroquina (B), mefloquina (G), primaquina (L), lumefantrina (Q) e carbamazepina (V), a amostra do limite superior de quantificação para a cloroquina (C), mefloquina (H), primaquina (M), lumefantrina (R) e carbamazepina (W) e a repetição da amostra branco injetada previamente para a cloroquina (D e E), mefloquina (I e J), primaquina (N e O), lumefantrina (S e T) e carbamazepina (X e Y). Não foi observado contaminação acima de 20 % da área do limite inferior de quantificação para os analitos e 5 % da área do padrão interno.

Fonte: (Do autor, 2016).

#### 4.3.9 Teste de precisão e exatidão (TPE)

O método bioanalítico também foi avaliado através da eficiência do procedimento de extração quanto à sua repetibilidade e reprodutibilidade.

Um procedimento de extração é considerado preciso e exato quando amostras de mesma concentração apresentam razões de área entre o analito e padrão interno semelhantes (baixa dispersão) e quando a concentração calculada apresenta desvio de no máximo  $\pm 20\%$  em relação ao valor nominal para as amostras referentes ao limite inferior de quantificação e  $\pm 15\%$  para as demais concentrações utilizadas na curva de calibração e nos controles de qualidade.

O procedimento foi repetido por três dias distintos onde foi realizada a avaliação da precisão e exatidão em dois parâmetros diferentes: a precisão e exatidão entre o coeficiente de variação das amostras de controles de qualidade preparadas no mesmo dia, assim como sua exatidão e desvio em relação ao valor nominal (precisão intradia) e o coeficiente de variação entre as médias de amostras de controles de qualidade preparadas em dias diferentes, assim como sua exatidão e desvio em relação ao valor nominal (precisão interdia).

O procedimento de diluição das amostras em matriz biológica também foi avaliado através do ensaio de precisão e exatidão, uma vez que segundo a legislação, não é permitido estimar valores de amostras biológicas cuja concentração extrapole o limite superior de quantificação (LSQ) da linearidade avaliada para os analitos no método bioanalítico.

O teste de diluição foi realizado através da diluição de amostras de controle de qualidade que apresentavam concentração acima da curva de calibração, após a adição de partes iguais (diluição em 50%) de matriz biológica isenta de analito e quantificadas juntamente com os demais controles de qualidade.

O processo de diluição para as amostras de matriz biológica adsorvidas em papel filtro apresentou um elevado grau de dificuldade, uma vez que não foi possível realizar a diluição da matriz adsorvida em papel filtro, pois esta técnica de manuseio das amostras revelou uma limitação física para o procedimento.

A diluição das amostras foi realizada através da extração da amostra a ser diluída, em concentração referente ao dobro da concentração do CQA, e de uma amostra de BPZ extraída em paralelo à extração, com ambas as amostras seguindo o método de extração proposto pelo trabalho.

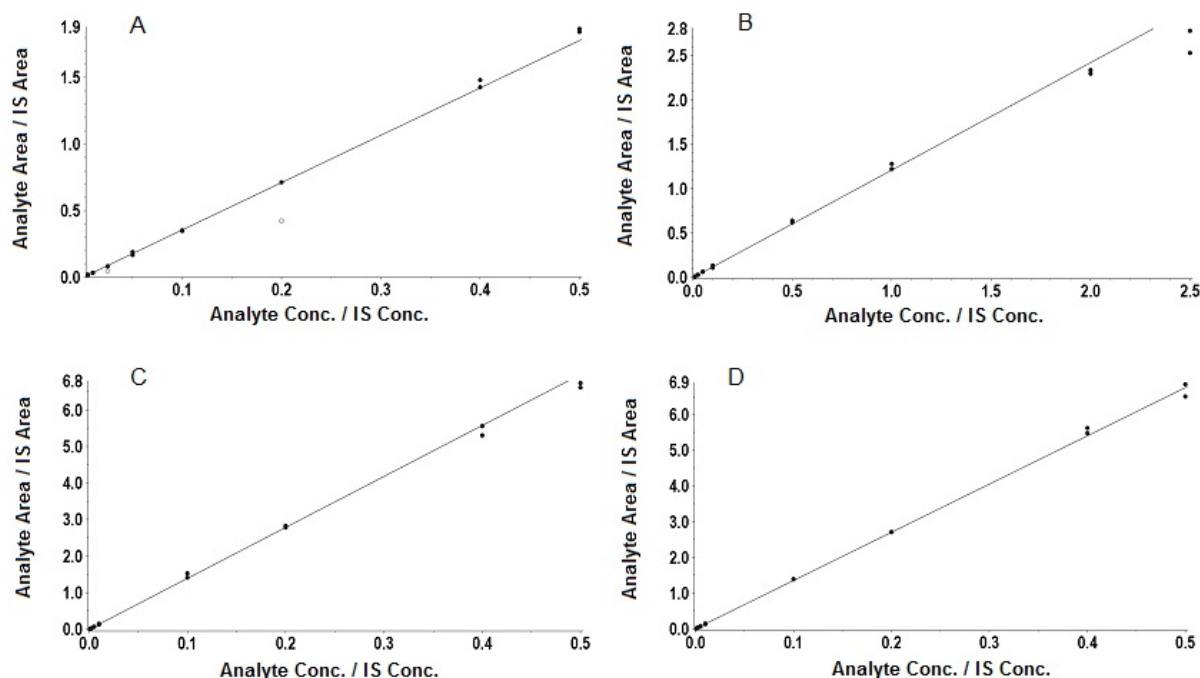
Este procedimento foi realizado com o objetivo de minimizar o efeito de matriz que poderia ter sido observado durante a diluição do extrato contendo matriz biológica e o solvente de extração, uma vez que o comportamento das substâncias do analito e padrão interno se difere quando ocorre alteração da quantidade de matriz biológica, solventes orgânicos e pH do meio.

Conforme descrito na legislação RDC N° 27/2012 da ANVISA atualmente em vigor, o ensaio de precisão e exatidão é considerado aprovado quando a curva de calibração contendo o intervalo de linearidade proposto no método bioanalítico utilizado para a quantificação das amostras de controle de qualidade, apresenta aprovação de 75 % do total de pontos utilizados (mínimo de seis concentrações diferentes aprovadas) e quando as amostras referentes aos controles de qualidade apresentam coeficiente de variação (CV %) entre as réplicas e exatidão/desvio da média das réplicas em relação ao valor nominal entre  $\pm 20$  % para as amostras referentes ao LIQ e  $\pm 15$  % para as amostras referentes ao CQB, CQM, CQA e CQD, avaliadas nos períodos intra-dia e inter-dia.

Para o parâmetro intradia foi observado no primeiro dia do ensaio precisão (CV %) mínima de 2,29 % para o CQB da primaquina e máxima de 11,88 % para o CQB da lumefantrina e exatidão mínima de 86,18 % para o CQB da lumefantrina e máxima de 106,45 % para o CQD da lumefantrina.

As curvas de calibração (figura 29) referentes ao primeiro dia do teste de precisão e exatidão para os analitos cloroquina, primaquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20$  % para o LIQ ou  $\pm 15$  % para as demais concentrações, enquanto que para a mefloquina, dois pontos foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios.

Figura 29 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 01), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 26. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal da amostra, em ng/mL.

Tabela 26 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE01.

Substância	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	3,560	-0,001750	0,9972
Mefloquina	1,230	-0,001810	0,9968
Primaquina	14,000	-0,011200	0,9979
Lumefantrina	13,500	0,000704	0,9982

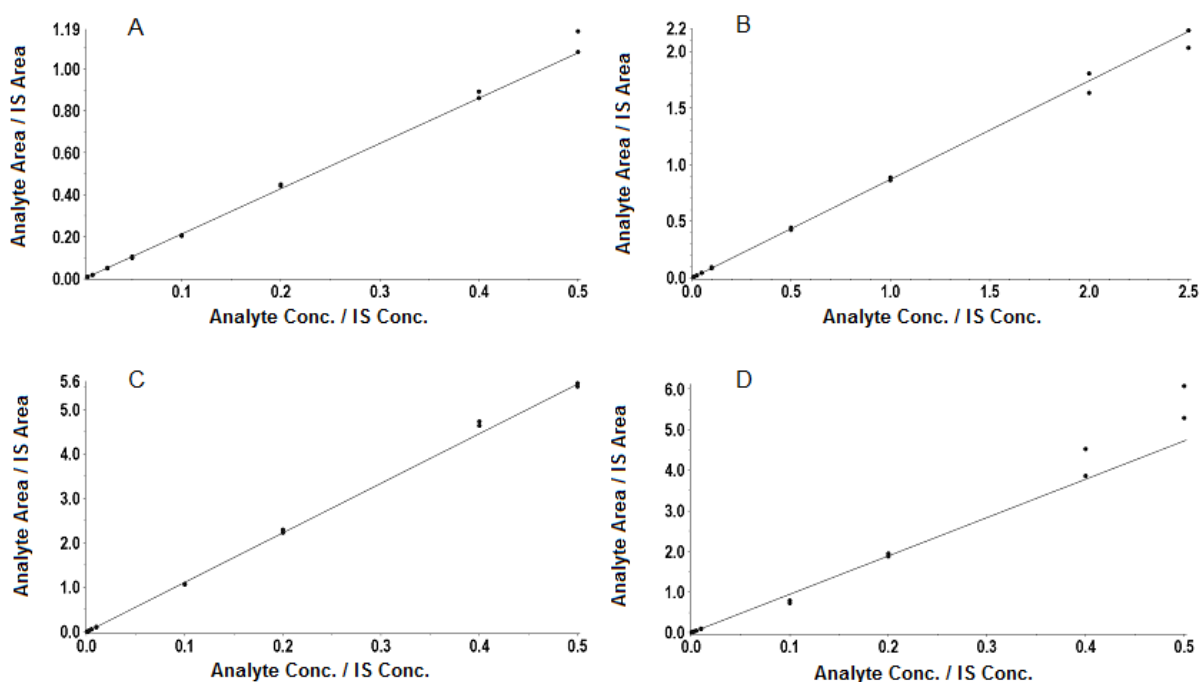
Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no primeiro teste de precisão e exatidão.

Fonte: (Do autor, 2016).

No segundo dia do ensaio foi observada precisão (CV %) mínima de 2,42 % para o CQA da mefloquina e máxima de 15,16 % para o LIQ da primaquina e exatidão mínima de 87,44 % para o CQD da mefloquina e máxima de 109,45 % para o LIQ da lumefantrina.

As curvas de calibração (figura 30) referentes ao segundo dia do teste de precisão e exatidão para os analitos cloroquina, primaquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20\%$  para o LIQ ou  $\pm 15\%$  para as demais concentrações, enquanto que para a mefloquina, dois pontos foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios.

Figura 30 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 02), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 27. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal da amostra, em ng/mL.

Tabela 27 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE02.

Substância	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> )
Cloroquina	2,160	-0,002570	0,9976
Mefloquina	0,870	-0,001640	0,9990
Primaquina	11,100	-0,007280	0,9988
Lumefantrina	9,250	-0,000396	0,9954

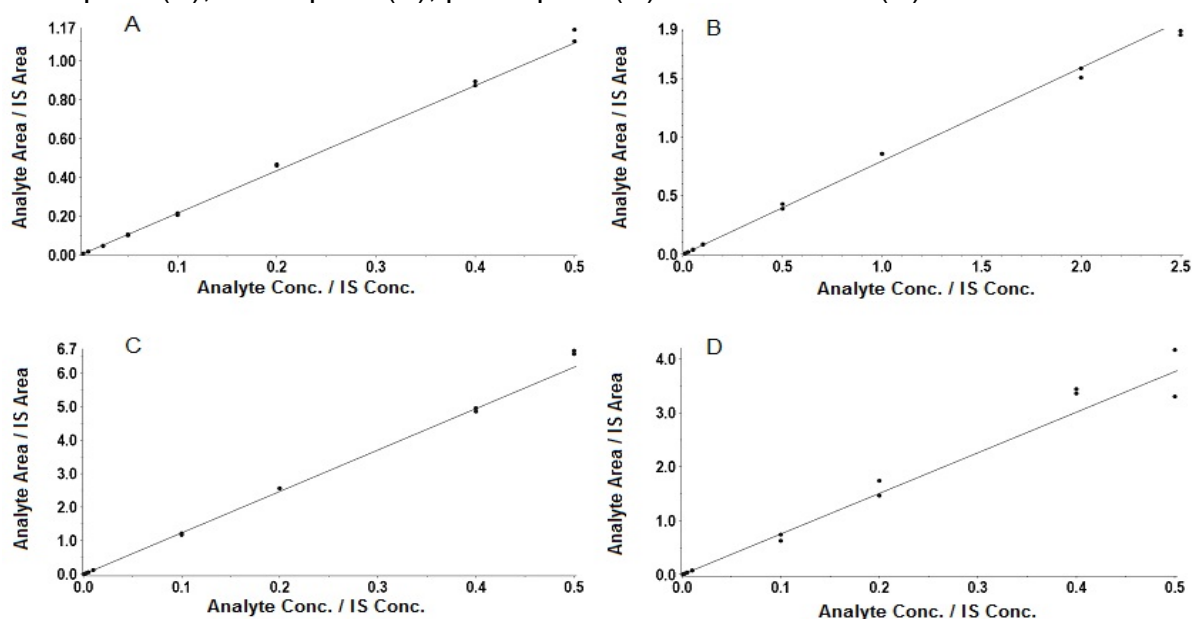
Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no segundo teste de precisão e exatidão.

Fonte: (Do autor, 2016).

Como fase final do ensaio de precisão e exatidão intradia, no terceiro dia foi observada precisão (CV %) mínima de 3,48 % para o LIQ da cloroquina e máxima de 12,83 % para o LIQ da primaquina e exatidão mínima de 90,66 % para o CQB da lumefantrina e máxima de 115,87 % para o LIQ da primaquina.

As curvas de calibração (figura 31) referentes ao terceiro dia do teste de precisão e exatidão para os analitos cloroquina, primaquina e lumefantrina não possuíram pontos com desvio em relação ao valor nominal superior a  $\pm 20\%$  para o LIQ ou  $\pm 15\%$  para as demais concentrações, enquanto que para a mefloquina, dois pontos foram excluídos por não se enquadrarem nestes critérios.

Figura 31 - Curvas de calibração representativas referentes ao teste de precisão e exatidão (dia 03), utilizadas para a quantificação dos controles de qualidade da cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2016).

Os valores referentes ao coeficiente angular e linear, assim como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos após a análise da curva de calibração de cada um dos analitos do estudo estão apresentados na tabela 28. O método dos mínimos quadrados ponderados foi utilizado, com peso  $1/X^2$ , onde  $X$  é a concentração nominal da amostra, em ng/mL.

Tabela 28 - Resultados dos parâmetros da curva de calibração obtidos no TPE03.

Substância	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )
Cloroquina	2,190	-0,003270	0,9985
Mefloquina	0,796	-0,001180	0,9974
Primaquina	12,400	-0,009990	0,9980
Lumefantrina	7,910	-0,000659	0,9974

Resultados referentes ao coeficiente angular, linear e de determinação obtidos para as curvas de calibração dos analitos no terceiro teste de precisão e exatidão.

Fonte: (Do autor, 2016).

Para o parâmetro interdia foi observada precisão (CV %) mínima de 1,87 % para o CQB da cloroquina e máxima de 10,58 % para o LIQ da lumefantrina e exatidão mínima de 89,64 % para o CQB da lumefantrina e máxima de 108,41 % para o LIQ da primaquina.

A tabela 29 apresenta os dados obtidos de amostras extraídas de controle de qualidade nas concentrações propostas de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, referentes ao teste de precisão e exatidão para os quatro analitos de interesse do estudo, segundo os critérios de avaliação estabelecidos na legislação em vigor, precisão e exatidão intradia e interdia.

Todas as amostras foram aprovadas segundo os artigos 28 e 30 da resolução RDC N° 27/2012 da ANVISA.

Tabela 29 - Resultados do teste de precisão e exatidão intradia e interdia realizado para os quatro analitos monitorados pelo método bioanalítico desenvolvido.

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Dia 01			Dia 02			Dia 03			Interdia		
		Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	Média (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Cloroquina	5,00	4,80	11,68	95,90	4,88	4,29	97,60	5,07	3,48	101,37	4,91	2,84	98,29
	10,00	9,13	5,72	91,30	8,92	4,10	89,20	9,26	5,61	92,58	9,10	1,87	91,03
	200,00	202,16	5,93	101,08	191,30	2,79	95,65	195,26	4,22	97,63	196,24	2,80	98,12
	400,00	423,42	2,43	105,86	397,30	2,42	99,32	426,31	5,02	106,58	415,68	3,84	103,92
	400,00 *	425,63	2,55	106,41	381,17	2,81	95,29	428,77	6,04	107,19	411,86	6,46	102,96
Mefloquina	10,00	9,55	8,35	95,51	10,05	4,89	100,50	10,69	6,03	106,94	10,10	5,67	100,98
	25,00	23,85	8,24	95,40	23,49	6,57	93,98	24,89	6,28	99,56	24,08	3,01	96,31
	1000,00	1007,14	4,56	100,71	929,89	2,72	92,99	1014,27	4,67	101,43	983,77	4,76	98,38
	2000,00	1938,80	2,53	96,94	1834,18	3,84	91,71	2088,15	6,51	104,41	1953,71	6,53	97,69
	2000,00 *	1920,83	4,08	96,04	1748,71	5,71	87,44	2130,64	6,87	106,53	1933,39	9,89	96,67
Primaquina	1,00	1,03	5,38	102,70	1,07	15,16	106,67	1,16	12,83	115,87	1,08	6,23	108,41
	2,50	2,25	2,29	89,85	2,27	5,18	90,80	2,56	4,94	102,39	2,36	7,40	94,34
	200,00	199,32	3,70	99,66	193,26	5,28	96,63	211,16	4,23	105,58	201,25	4,53	100,62
	400,00	386,15	4,94	96,54	419,40	2,93	104,85	443,51	5,85	110,88	416,35	6,92	104,09
	400,00 *	393,70	5,76	98,43	425,03	3,83	106,26	442,18	6,69	110,55	420,30	5,85	105,08
Lumefantrina	1,00	0,89	10,71	88,80	1,09	6,48	109,45	1,04	10,03	103,60	1,01	10,58	100,62
	2,50	2,15	11,88	86,18	2,30	6,86	92,08	2,27	9,41	90,66	2,24	3,43	89,64
	200,00	190,80	10,68	95,40	181,16	6,73	90,58	183,25	6,49	91,62	185,07	2,74	92,53
	400,00	409,84	4,80	102,46	419,40	9,46	104,85	442,11	12,34	110,53	423,78	3,91	105,95
	400,00 *	425,80	7,61	106,45	377,48	10,65	94,37	446,99	7,94	111,75	416,75	8,55	104,19

Resultados referentes ao teste de precisão e exatidão (TPE), para amostras de controle de qualidade contendo concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD para os quatro analitos do estudo. Todos os analitos foram aprovados por apresentar coeficiente de variação entre as amostras e exatidão em relação ao valor nominal entre  $\pm 20\%$  para o LIQ e  $\pm 15\%$  para as demais concentrações. O asterisco sinaliza os controles de qualidade submetidos ao procedimento de diluição em 50% de sua concentração original.

Fonte: (Do autor, 2016).



#### **4.4 Aplicação do método desenvolvido e validado na análise das amostras em matriz biológica dos indivíduos em tratamento contra a malária para a avaliação da adesão do tratamento**

Uma vez o método totalmente desenvolvido e validado, as amostras biológicas originadas dos pacientes foram analisadas para verificar a adesão ao tratamento, bem como sua eficácia através da correlação com os dados clínicos e avaliação médica (dados não mostrados neste trabalho), .

Inserido na atual estratégia no tratamento da malária no Brasil, uma nova formulação de cloroquina + primaquina foi sintetizada e testada na área endêmica da malária do Brasil para avaliar a aderência e eficácia do tratamento dos indivíduos infectados (PEREIRA et al, 2016).

A análise das amostras de indivíduos em tratamento da malária foi conduzida em grupos de voluntários separados através do esquema de tratamento utilizado, onde medicamentos específicos foram administrados.

Em um primeiro momento foram analisados todos os indivíduos tratados com a combinação de cloroquina + primaquina, seguido pelo grupo de pacientes tratados com o esquema de mefloquina + primaquina e por último o grupo de indivíduos tratados pela administração de lumefantrina + primaquina.

O método desenvolvido foi capaz de extrair e quantificar as amostras de sangue total coletadas de indivíduos em tratamento contra a malária na região norte, em um centro bioanalítico localizado na região sudeste do país, uma vez que foi utilizado o transporte das mesmas em microtubo contendo papel filtro. Os fármacos considerados primários no tratamento da malária no Brasil (cloroquina, mefloquina e lumefantrina) administrados ao pacientes se enquadraram na linearidade proposta para os analitos do trabalho.

A primaquina, como citado anteriormente, não obteve concentração significativa nos tempos de coleta realizados no modelo estabelecido pelo trabalho (em dias), uma vez que é conhecida que a meia vida de eliminação deste fármaco é relativamente baixa, em cerca de 1,8 a 4,0 horas (OMS, 2015).

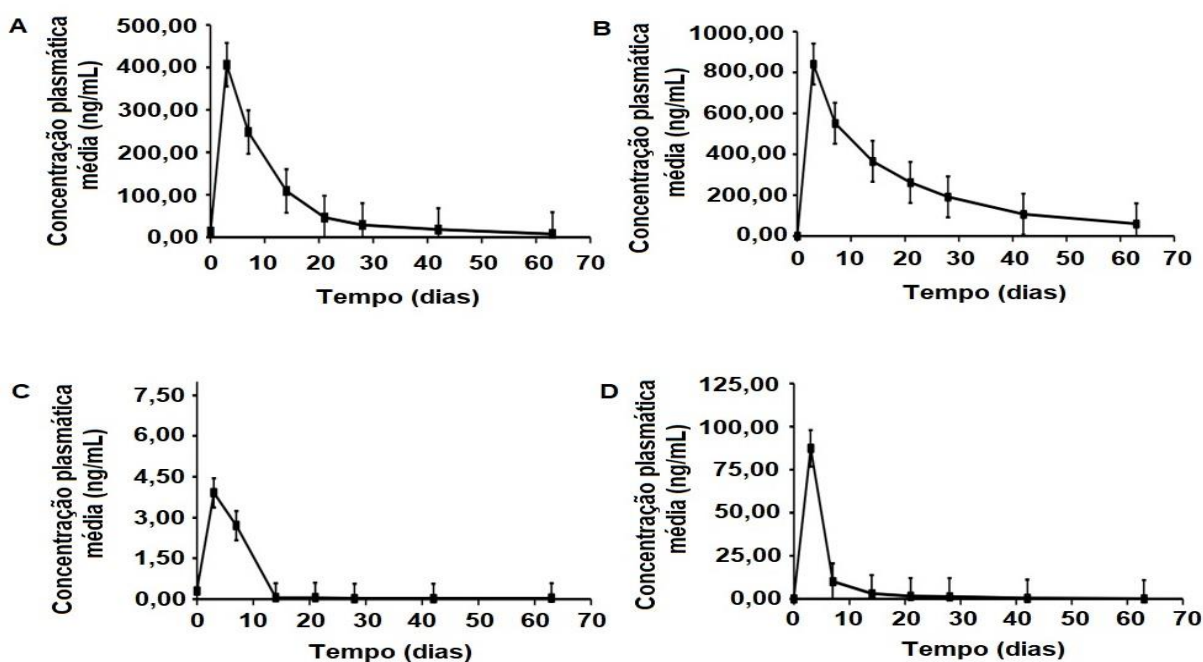
Para efeito da avaliação da adesão do tratamento foram observados os parâmetros de absorção e eliminação do medicamento, uma vez que a presença de picos cromatográficos nas amostras desconhecidas indicou que houve a administração do medicamento.

A figura 32 ilustra a média das concentrações plasmáticas obtidas após a análise das amostras originadas dos indivíduos submetidos ao tratamento contra a malária, apresentadas de maneira individual para medicamento administrado de acordo com o esquema de tratamento proposto, com um total de 58 indivíduos em tratamento com esquema terapêutico utilizando cloroquina + primaquina, 60 indivíduos sendo tratados com mefloquina + primaquina, 58 indivíduos em tratamento com lumefantrina + primaquina e todos os 176 indivíduos após a administração de primaquina em concomitância com um dos três fármacos citados anteriormente.

O método desenvolvido e validado obteve êxito na verificação da adesão ao tratamento contra a malária, uma vez que na presença ou ausência de uma resposta analítica (picos cromatográficos), é possível afirmar se o indivíduo cumpriu ou não com o protocolo de administração dos medicamentos do Programa Nacional de Combate da Malária.

A ferramenta proposta neste trabalho permitiu uma nova abordagem no controle da adesão dos pacientes ao tratamento contra a malária realizada pelo serviço público.

Figura 32 - Média das concentrações plasmáticas de indivíduos em tratamento contra a malária com cloroquina (A), mefloquina (B), primaquina (C) e lumefantrina (D).



Fonte: (Do autor, 2017).

## 5 CONCLUSÃO

Apesar do recente avanço na diminuição do número de casos confirmados para a malária, é fundamental que as políticas públicas de combate e controle de doenças infecciosas não sofram diminuição em seu investimento, uma vez que quando se obtém sucesso no controle e o número de casos inicia o seu declínio, há a percepção, por parte dos gestores da área de saúde, de que o problema está deixando de ser tão importante quanto no passado e de que, portanto, já não merece tanta atenção.

O Brasil recebeu em 2015 o *Malaria Champions of the Americas Award 2015*, entregue ao Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde, na sede da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS), em Washington D.C., nos Estados Unidos da América. Essa é a quarta vez que o país é premiado por seu esforço para reduzir os casos de malária, mas a primeira vez que é reconhecido como o primeiro colocado.

A ferramenta auxiliar para a verificação da adesão ao tratamento da malária apresentada por este trabalho poderia ser utilizada tanto na área endêmica da malária, localizada na região norte do país, quanto para casos localizados por todo território nacional, uma vez que a metodologia se enquadra na atual política de saúde pública, onde curar os doentes é de fundamental importância para tentar reduzir a circulação do *Plasmodium* sp. Além disso, a estrutura física dos centros de pesquisas clínicas, capazes de realizar a coleta das amostras dos pacientes e das centrais bioanalíticas, onde seria realizada a análise desse material biológico, já se encontra instalada e operante. Estas centrais estão ligadas ao SUS através da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), com unidades espalhadas em diversos estados do território nacional, como Amazonas e Rondônia (Unidades Clínicas) e Rio de Janeiro (Centro Bioanalítico), apresentados neste trabalho.

O método bioanalítico foi totalmente validado e apresentou-se altamente seletivo e específico quando para a aplicabilidade nas análises de amostras de sangue dos pacientes, uma vez que não há métodos disponíveis na literatura que possibilitem a análise dos fármacos utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Malária e disponibilizados pelo SUS.

O procedimento de coleta se mostrou capaz de produzir resultados bastante robustos, uma vez que o sangue total dos indivíduos participantes do trabalho foi coletado em tubo heparinizado e uma quantidade fixa de matriz biológica (100  $\mu$ L) foi transferida para um microtubo contendo um papel filtro.

O método de extração desenvolvido foi simples, rápido e seletivo, através da técnica de extração líquido-líquido e apresentou vantagens para os demais métodos de análises de substâncias antimaláricas existentes na literatura científica, uma vez que o custo foi bem menor do que métodos baseados na extração por fase sólida, onde além de ser uma alternativa cara, apresenta uma grande dificuldade analítica devido ao risco do entupimento dos cartuchos onde a amostra em questão é muitas vezes descartada e reensaiada.

Todos as unidades da FIOCRUZ utilizadas para a execução do trabalho encontraram-se certificadas por seus devidos órgãos reguladores, onde os principais parâmetros para a execução dos procedimentos foram realizados conforme as resoluções em vigor, e a rastreabilidade dos processos realizados pelos centros clínico e analítico foram controlados de maneira que a qualidade dos resultados estaria sendo garantida.

## REFERÊNCIAS

ALENCAR, F. H.; FERRARONI, J.J., SHRIMPTON, R. Resistência do *Plasmodium falciparum* ao fansidar, quinina e tetraciclina. **Revista de Saúde Pública**, v.16, p.299-302, 1982.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Nota técnica 04/2014, Orientações a Respeito do Artigo 7º, da resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012: Ensaio a serem realizados quando houver a administração de fármacos concomitantes durante estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 11 out. 2014.

\_\_\_\_\_. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 17 mai. 2012.

ARAÚJO, D. S.; SILVA, H. R. R.; FREITAS, R. M. Carbamazepina: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 4, p. 30-45, 2011.

AVULA, B. et al. Profiling primaquine metabolites in primary human hepatocytes using UHPLC-QTOF-MS with <sup>13</sup>C stable isotope labeling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, p. 276-285, 2013.

BARROSO, W. J. Malária: a crise global. **Revista Saúde & Vida Online**, 2001 disponível em: <<http://www.epub.org.br/svol/artigo77.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

BEVAN, A. P. et al. Chloroquine extends the lifetime of the activated insulin receptor complex in endosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 26833-26840, 1997.

BLESSBORN, D. et al. Development and validation of an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for determination of lumefantrine in capillary blood on sampling paper. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 282-287, 2007.

BRAITHWAITE A., SMITH F.J. **Chromatographic Methods**. 5. ed. Londres: Kluwer Academic Publishers, 1996.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Ciência e Cultura** [online], v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=s000967252003000100021&script=sci\\_arttext](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=s000967252003000100021&script=sci_arttext)>. Acesso em: 12 mar. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The History of Malaria, an Ancient Disease**. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>> Acesso em: 12 out 2016.

CESAR, I. C., **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano**. 2009. 273 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Coord.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006.

COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 7-20, 2009.

COLLINS, W. E., *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. **The Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 107-121, 2012.

CORTOPASSI, W. A. et al. Dinâmica molecular do complexo heme-cloroquina na enzima lactato desidrogenase de *Plasmodium falciparum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis, 2011. **[Anais...]**. Santa Catarina: SBQ, 2011.

CROTTI, A. E. M. Espectrometria de massas com ionização por “*electrospray*”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CUNICO, W. et al. Fármacos antimalariais: história e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2008.

DESJARDINS, R. E. et al. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. **Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 372-379, 1979.

EZZET, F. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine (benflumetol) in acute falciparum malária. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

FLETCHER, K. A. et al. Studies on the pharmacokinetics of primaquina. **Bulletin Of The World Health Organization**, v. 59, n. 3, p. 407-412, 1981.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; VILLAR, J. D. F. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FRASSON, A. P. et al. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 201-208, 2009.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. **Museu da FUNASA**. 2011. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/site/museu-da-funasa/sucam/>>. Acesso em: 12 out. 2016.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Agência Fiocruz de Notícias. **Malária**. 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/mal%C3%A1ria>>. Acesso em: 15 out. 2016.

GOVENDER, K. et al. Development and validation of a LC-MS/MS method for the quantitation of lumefantrine in mouse whole blood and plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 985, p. 6-13, 2015.

GUTMAN, J. et al. Mefloquine pharmacokinetics and mefloquine-artesunate effectiveness in Peruvian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, v. 8, 2009.

van HELLEMOND, J. J. et al. Human *Plasmodium knowlesi* Infection Detected by Rapid Diagnostic Tests for Malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1478-1480, 2009.

HAAS, L. F. Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922). **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 67, p. 520, 1999.

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**. 7. Ed. São Paulo: Editora LTC, 2008.

HELLGREN, U.; VILLEN, T.; ERICSSON, O. High-performance liquid chromatographic determination of quinine in plasma, whole blood and samples dried on filter paper. **Journal of Chromatography**, v. 528, p. 221-227, 1990.

HOCHMAN, G.; ARRETCHE, M.; MARQUES, E. **Políticas públicas no Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://books.cielo.org>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

HODEL, E. M. et al. 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. 877, p. 867-886, 2009.

HUANG, L. et al. A Modified Method for Determination of Lumefantrine in Human Plasma by HPLC-UV and Combination of Protein Precipitation and Solid-Phase Extraction: Application to a Pharmacokinetic Study. **Analytical Chemistry Insights**, v. 5, p.15-23, 2010.

JAMES, S. P.; NICOL, W. D.; SHUTE, P. G. *Plasmodium ovale* Stephens 1922. **Journal of Parasitology**, v. 25, n. 1, 1933. Publicado online: 01 abr. 2009.

KATZUNG, B., **Farmacologia básica e clínica**. 10. Ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2010.

KIM, Y. R. et al. Pharmacokinetics of Primaquine and Carboxyprimaquine in Korean Patients with Vivax Malaria. **Archives of Pharmacological Research**, v. 27, n. 5, p. 576-580, 2004.

KJELLIN, L. L. et al. Determination of the antimalarial drug piperazine in small volume pediatric plasma samples by LC-MS/MS. **Journal of Bioanalysis**, v. 6, n. 23, p. 3081-3089, 2014.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, 2009.

LI, T. et al. Determination of primaquine and hepatic targeting neoglycoalbumin-primaquine in whole blood and liver of mouse by normalphase high-performance liquid chromatography. **Huaxi Yike Daxue Xuebao**, v. 26, n.1, p. 109-120, 1995.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n.4, p. 235-244, 2002.



MALARIA FOUNDATION INTERNATIONAL. Learning about malaria. **The Scientific Advisory Board**. Disponível em: <[http://www.malaria.org/index.php?option=com\\_frontpage&Itemid=1](http://www.malaria.org/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1)>. Acesso em: 22 ago. 2015.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MARCSISIN, S. R.; REICHARD, G.; PYBUS, B. S. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 161, p. 1-10, 2016.

MARSON, B. M. et al. Simultaneous Determination of Antimalarial Agents by LC-MS/MS and Its Application to Evaluation of Fixed-Dose Tablets. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 615-621, 2017.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. **Malária**. Disponível em: <<http://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/malaria>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010. 38 p.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Diretoria Técnica de Gestão. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília, 2015. 118 p.

\_\_\_\_\_. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de terapêutica da malária**. Brasília, 2001. 105 p.

\_\_\_\_\_. Brasil registra menor número de casos de malária nos últimos 35 anos. **Portal da Saúde do SUS**, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/23368-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM**. Brasília, 2013. 132 p.

MILLER, A.K. et al. Pharmacokinetic interactions and safety evaluations of coadministered tafenoquine and chloroquine in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 858-867, 2013.

MINZI, O. M. S. et al. High-performance liquid chromatographic method for determination of amodiaquine, chloroquine and their monodesethyl metabolites in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 473-480, 2003.

MOORE, B. R. et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Allometric Scaling of Chloroquine in a Murine Malaria Model, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8 p. 3899-3907, 2011.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MORRIS, C. A. et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin in pregnant and non-pregnant women with malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 114, 2011.

MOUNIKA, D. et al. Lumefantrine: A Review on Analytical Methods, **British Journal of Medical and Health Research**, v. 2, n. 5, 2015.

MUNJAL V., LC-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of Lumefantrine in Human Plasma and Its Application to Bioequivalence Study. **Chromatographia**, v. 71, n. 5/6, 2010.

MWEBAZA, N. **Effect of local food on lumefantrine bioavailability and population pharmacokinetics in ugandan children with malaria**, 2016. 73 f. Thesis (Doctoral Degree in Pharmacology) – Division Of Clinical Pharmacology, Department Of Laboratory Medicine Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2016.

NA-BANGCHANG, K. et al. Determination of Primaquine in Whole Blood and Finger-Pricked Capillary Blood Dried on Filter Paper Using HPLC and LCMS/MS. **Chromatographia**, v. 77, n. 7, p. 561-569, 2014.

\_\_\_\_\_. The pharmacokinetics of chloroquine in healthy Thai subjects and patients with Plasmodium vivax malaria. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, p. 278-281, 1994.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia, Princípios Básicos e técnicas afins**, Editora Interciência, 2003.

NTALE M. et al. A field-adapted sampling and HPLC quantification method for lumefantrine and its desbutyl metabolite in whole blood spotted on filter paper. **Journal of Chromatography B**, v. 876, p. 261-265, 2008.

OLLIARO, P. et al. Pharmacokinetics and comparative bioavailability of artesunate and mefloquine administered separately or as a fixed combination product to healthy volunteers and patients with uncomplicated plasmodium falciparum malaria. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 2, p. 59-66, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for the treatment of malaria**. Genebra, 2015. 317 p. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2016.

\_\_\_\_\_. **The World Malaria Report**. Genebra, 2008. 190 p. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/>>. Acesso em: 20 out. 2014.

\_\_\_\_\_. **The World Malaria Report**. Genebra, 2015. 280 p. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. **The World Malaria Report**. Genebra 2016. 186 p. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/)>. Acesso em: 27 jan. 2017.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Centro Regional de Informação das Nações Unidas. **Luta contra a malária em África está a dar fruto, mas subsistem desafios, segundo UNICEF**. Disponível em: <<http://www.unric.org/pt/actualidade/28059-luta-contra-a-malaria-em-africa-esta-a-dar-fruto-mas-subsistem-desafios-segundo-unicef>>. Acesso em: 22 out. 2015.

PAGE-SHARP M. et al. Simultaneous determination of primaquine and carboxyprimaquine in plasma using solid phase extraction and LC-MS assay. **Journal of Chromatography B**, v. 902, p. 142-146, 2012.

PEREIRA, D. et al. Safety, efficacy and pharmacokinetic evaluations of a new coated chloroquine tablet in a single-arm open-label non-comparative trial in Brazil: a step

towards a user-friendly malaria vivax treatment. **Malaria Journal**, v. 15, p. 477-487, 2016.

PINGALE S. G.; MANGAONKAR K.V. Quantification of Lumefantrine in Human Plasma Using LC-MS/MS and Its Application to a Bioequivalence Study. **Journal of Pharmaceutics (Cairo)**, 2013.

PLESSIS, L. H. et al. In vivo efficacy and bioavailability of lumefantrine: evaluating the application of pheroid technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 68-77, 2015.

POLAGANI, S. R. et al. Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and Glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 1, p. 9-19, 2013.

POTTER, B. M. J. et al. Differential CYP 2D6 metabolism alters primaquine pharmacokinetics. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2380-2387, 2015.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. Activities of artesunate and primaquine against asexual and sexual stage parasites in falciparum malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1329-1334, 2004.

RANG H.P. et al. **Pharmacology**. 7. ed. Londres: Ed. Churchill Livingstone, 2012.

RUBIRA, Fábio. Brasil avança no controle da malária. **Jornal da USP**, São Paulo, 02 jan. 2017. Disponível em: <<http://jornal.usp.br/atualidades/brasil-avanca-no-controle-da-malaria/>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

SENER, E. et al. Determination of Carbamazepine and its Main Metabolite Carbamazepine-10, 11-Epoxy in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI-LC-MS (Ion Trap). **Chromatographia Supplement**, v. 66, p. S31-S36, 2007.

SILVA, R.; PAIVA, C. H. A. O governo JK e o Grupo de Trabalho de Controle e Erradicação da Malária no Brasil: encontros e desencontros nas agendas brasileira e internacional de saúde, 1958-1961. **Revista História, Ciências, Saúde**, v. 22, n. 1, p. 95-114, 2015.

SINGHAL P. et al. 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.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. **Principles of instrumental analysis**. 4. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1992.

SLATER A. F. G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n.2-3, p. 203-235, 1993.

SOUZA, L.M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**, 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica)– Pós-Graduação Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

SRINIVAS. Malária parasites. **MALARIASITE**. Disponível em <<http://www.malariasite.com/malaria-parasites/>>. Acesso em: 01 jul. 2016.

VALEA, I. et al. Pharmacokinetics of co-formulated mefloquine and artesunate in pregnant and non-pregnant women with uncomplicated *Plasmodium falciparum* infection in Burkina Faso. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2499-2507, 2014.

WAHAJUDDIN; SINGH, S.P.; JAIN, G.K. Determination of lumefantrine in rat plasma by liquid-liquid extraction using LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 1133-1139, 2009.

WHITE N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. **Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 172-173, 2008.

WILSON & WALKER. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. Cambridge: Ed. Cambridge University Press, 2010.

## APÊNDICE A - DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL - CEPEM

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para malária por Plasmodium vivax não complicada.

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Dhelio Batista Pereira

**Versão:** 1

**Instituição:** Centro de Pesquisa em Medicina Tropical -  
CEPEM -Rondônia

**CAAE:** 05462612.7.0000.0011

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 74869

**Data da Relatoria:** 07/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo randomizado, de pesquisa clínica da eficácia de três braços, prospectivo, controlado, aberto, não comparativo para avaliação das respostas clínicas e parasitológicas do tratamento da malária vivax não complicada, com administração diretamente observada das drogas. Os pacientes com P. vivax não complicada que atenderem aos critérios de inclusão serão tratados e monitorados por 63 dias. Estes acompanhamentos serão visitas previamente estabelecidas por um calendário que avaliará de forma clínica e laboratorial correspondente. Com base nestas avaliações, os pacientes serão classificados como falha terapêutica ou cura. A proporção de pacientes com falha terapêutica durante os acompanhamentos será usada para estimar a eficácia dos produtos teste.

**Combinações:**

- 1 - Artesunato e Mefloquina comprimidos de 100 + 200 mg produzidos pela farmanguinhos e Primaquina 15 mg produzido pela farmanguinhos;
- 2 - Cloroquina 150 mg e primaquina 15 mg produzidos por Farmanguinhos/FIOCRUZ;
- 3 - Artemeter e lumefantrina 20 + 120 mg produzidos por CIPLA e primaquina 15 mg por Farmanguinhos.

O cálculo amostral final com perda de 20% da amostra, serpa de 88 pacientes por braço, um total de 264 pacientes deverá ser incluído no estudo. Onde a taxa de recrutamento é de 30 pacientes recrutados por mês. O estudo tem um prazo total de 36 meses incluindo todos os processos usuais de pesquisa clínica (recrutamento, inclusão, acompanhamento, análise dos dados).

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a eficácia terapêutica e segurança de combinações de medicamentos baseados em derivados da artemisina e o esquema de cloroquina e primaquina atualmente recomendados pelo PNCM para tratamento da Malária por P. vivax não complicada.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não é esperado que pacientes envolvidos no estudo corram risco de morte. Um plano de gerenciamento de risco que vai de Baixo a Catastrófico foi estabelecido com probabilidades que variam de remoto, improvável, possível, provável e Certo, foi estabelecido pelo projeto e para todos os níveis de risco uma medida ou recurso que deverão ser adotados imediatamente. O projeto dispõe de uma equipe com médicos, enfermeiros, técnicos, biólogo, que disponibiliza atendimento 24 horas a partir do momento da assinatura do TCLE. O projeto faz uma justificativa do atendimento prestado a comunidade desde 1991, tanto de Porto Velho, quanto das regiões circuvizinhas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é de importantíssimo avanço para o PNCM, como para o Estado de Rondônia e o CEPEM, que inicia sua prática na pesquisa clínica, imprescindível para segurança de aplicação de novos tratamentos para malária, que tende a se adaptar aos tratamentos recomendados, necessitando da introdução de novas drogas. O projeto desde seu início, mostrou-se dentro dos padrões éticos de pesquisa com todas as

recomendações internacionais para pesquisa clínica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos de apresentação em conformidade com a resolução CNS 196/96 e conforme Documento das Américas.

**Recomendações:**

RECOMENDAMOS A CONTINUIDADE DE COMUNICAÇÃO, BEM COMO DE JUSTIFICATIVAS SOBRE TODOS OS ACONTECIMENTOS PERTENCENTES AO PROJETO.  
RECOMENDAMOS TAMBÉM O ENVIO PERIODICO DE RELATÓRIOS PARA ACOMPANHAMENTO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Este projeto já havia sido anteriormente aprovado, tendo sido inserido na Plataforma Brasil, com alterações referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.  
Este CEP, aprova as alterações referente ao TCLE, estando de acordo com todas as recomendações internacionais para acontecimento de pesquisa clínica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PARECER APROVADO VERSÃO 2.0

**Na data de emissão desse parecer estava pendente (1) parecer de instituições coparticipantes.**

PORTO VELHO, 15 de Agosto de 2012

---

Assinado por:  
Carla Freire Celedonio Fernandes



CENTRO DE PESQUISA EM  
MEDICINA TROPICAL - CEPEM



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para malária por *Plasmodium vivax* não complicada.

**Pesquisador:** Dhelio Batista Pereira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 05462612.7.0000.0011

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM -Rondônia

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 644.709

**Data da Relatoria:** 11/04/2014

### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda para inclusão de um novo centro participante do estudo, a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado de Manaus, sob responsabilidade do Pesquisador Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, em virtude do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) ter incluído no estudo um número inferior de participantes previstos pela pesquisa. Com esta inclusão espera-se que "n" amostral esperado no estudo seja alcançado, e que a pesquisa seja concluída ainda em 2014. No Centro a ser incluído será desenvolvido o mesmo protocolo que está em andamento em Porto Velho/RO, no CEPEM (Centro coordenador do estudo).

O estudo em questão propõe-se a avaliar a eficácia de duas combinações de medicamentos de antimaláricos baseadas em derivados da artemisinina e o tratamento recomendado atualmente, sendo testado os seguintes medicamentos: Combinação de dose fixa de artesunato e mefloquina, comprimidos de 100 +200 mg produzidos por Farmanguinhos/Fiocruz; Cloroquina 150 mg produzidos por Farmanguinhos/Fiocruz e Primaquina 15 mg produzidos por Farmanguinhos/Fiocruz.

### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia terapêutica e segurança de combinações de medicamentos baseados em

**Endereço:** Avenida Guaporé 215

**Bairro:** Lagoa

**CEP:** 76.812-329

**UF:** RO

**Município:** PORTO VELHO

**Telefone:** (69)3216-5442

**Fax:** (69)3219-6012

**E-mail:** cepesquisacepem@yahoo.com.br





## CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL - CEPEM



Continuação do Parecer: 644.709

derivados da artemisinina e o esquema de cloroquina e primaquina atualmente recomendado pelo PNCM para tratamento de malária por *Plasmodium vivax* não complicada

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Desde o princípio da execução do projeto, não é esperado que os participantes envolvidos no estudo corram riscos de morte. Foi desenhado um plano de gerenciamento de risco que vai de Baixo a Catastrófico, foi estabelecido com probabilidades que variam de remoto, improvável, possível, provável e Certo, foi estabelecido pelo projeto e para todos os níveis de risco uma medida ou recurso que foram adotados. O projeto dispõe de uma equipe com médicos, enfermeiros, técnicos, biólogo, que disponibiliza atendimento 24 horas a partir do momento da assinatura do TCLE.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A emenda submetida a este Comitê de Ética trata-se apenas da inclusão da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado de Manaus como centro participante do estudo, com a finalidade de aumentar a taxa de recrutamento de pacientes portadores de malária vivax não complicada, visto que o "n" amostral esperado não foi alcançado. Conforme documentação encaminhada, a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, dispõe de toda infraestrutura necessária para realização do estudo.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A emenda submetida atende aos critérios estabelecidos na Resolução CNS 466/2012 e suas complementares.

### **Recomendações:**

Recomenda-se a observância e atendimento dos itens listados abaixo da Resolução CNS 466/2012:

V.5 - O Sistema CEP/CONEP deverá ser informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal dos estudos por ele aprovados;

V.6 - O pesquisador, o patrocinador e as instituições e/ou organizações envolvidas nas diferentes fases da pesquisa devem proporcionar assistência imediata, nos termos do item II.3, bem como responsabilizarem-se pela assistência integral aos participantes da pesquisa no que se refere às complicações e danos decorrentes da pesquisa.

V.7 - Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas

Endereço: Avenida Guaporé 215

Bairro: Lagoa

CEP: 76.812-329

UF: RO

Município: PORTO VELHO

Telefone: (69)3216-5442

Fax: (69)3219-6012

E-mail: cepesquisacepem@yahoo.com.br



**CENTRO DE PESQUISA EM  
MEDICINA TROPICAL - CEPEM**



Continuação do Parecer: 644.709

diferentes fases da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A inclusão do Centro participante poderá ser realizada, visto que o projeto atende ao estabelecido na Resolução CNS 466/2012 e de suas complementares.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto em questão atende aos requisitos definidos pelos princípios biéticos para pesquisa em seres humanos, exigidos pelas resoluções do CNS. Não há impedimento ético para a realização do estudo.

Informações ao pesquisador:

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em seis meses após o início do estudo e ao término do estudo.

Endereço: Avenida Guaporé 215

Bairro: Lagoa

CEP: 76.812-329

UF: RO

Município: PORTO VELHO

Telefone: (69)3216-5442

Fax: (69)3219-6012

E-mail: cepesquisacepem@yahoo.com.br



CENTRO DE PESQUISA EM  
MEDICINA TROPICAL - CEPem



Continuação do Parecer: 644.709

PORTO VELHO, 12 de Maio de 2014

---

Assinador por:  
**FLÁVIA SERRANO BATISTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Avenida Guaporé 215

**Bairro:** Lagoa

**CEP:** 76.812-329

**UF:** RO

**Município:** PORTO VELHO

**Telefone:** (69)3216-5442

**Fax:** (69)3219-6012

**E-mail:** cepesquisacepem@yahoo.com.br



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que este Comitê de Ética em Pesquisa acatou decisão de APROVAÇÃO da Emenda do projeto **Estudo de avaliação de eficácia e segurança de tratamentos baseados em derivados da artemisinina para malária por Plasmodium vivax não complicada**, de interesse do pesquisador Dr. Dhelio Batista Pereira, 05462612.7.1001.0011, submetida em 28/03/2014 onde este CEP foi incluído como centro participante, pelo CEP do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEP/EM, conforme parecer consubstanciado emitido por aquele Colegiado, em data de 12 de maio de 2014.

Manaus, 12 de maio de 2014.

*Dra. Marilaine Martins*

Coordenadora-2 do CEP/FMT-HVD

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
 Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado FMT-HVD  
 Avenida Pedro Teixeira Nº 25, Bairro D. Pedro  
 CEP 69040-000 – Manaus-Amazonas, Brasil  
 FONE/FAX (92) 2127-3572 – PABX (92) 2127-3555  
 E. Mail: cep@fmt.am.gov.br



**ANEXO A - RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012****RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012**

DOU 22/mai/2012

*Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.*

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 10 de maio de 2012,

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente Substituto, determino a sua publicação:

CAPÍTULO I  
DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS  
Seção I  
Objetivo

Art. 1º Esta Resolução possui o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil.

Seção II  
Definições

Art. 2º Para efeito desta Resolução são adotadas as seguintes definições:

I- amostra branco: amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno;

II- amostra de controle de qualidade (amostra de CQ): amostra de matriz adicionada do analito em concentração específica, usada para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico;

III- amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 85% (oitenta e cinco por cento) da maior concentração da curva de calibração;

IV- amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até 3 (três) vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);

V- amostra de controle de qualidade de diluição (amostra de CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração (LSQ), analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré-definidos e especificados pelo laboratório bioanalítico;

VI- amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;

VII- amostra em estudo: amostra biológica que é objeto de análise;

VIII- amostra hemolisada: amostra biológica contendo hemácias lisadas em grau pré-definido e especificado pelo laboratório bioanalítico;

IX- amostra lipêmica: amostra com alto teor de lipídeos, por exemplo, proveniente de coleta pós prandial;

X- amostra processada: amostra pronta para análise instrumental;

XI- amostra zero: amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno (PI);

XII- amostras de fontes distintas: amostras biológicas originadas de diferentes indivíduos ou de diferentes lotes de mistura de amostras;

XIII- analito: composto químico específico a ser mensurado em uma matriz;

XIV- corrida analítica das amostras em estudo: análise de um conjunto de amostras processadas sob as mesmas condições, com quantificação por meio da mesma curva de calibração e validada pelas mesmas amostras de CQs;

XV- curva de calibração: relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito;

XVI- efeito matriz: efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica;

XVII- efeito residual (carryover): efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente;

XVIII- estudo de estabilidade: ensaio que visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas;

XIX- exatidão: concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência;

XX- limite inferior de quantificação (LIQ): menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

XXI- limite superior de quantificação (LSQ): maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz;

XXII- matriz: meio no qual os analitos em estudo serão quantificados;

XXIII- matriz biológica: meio de origem biológica no qual os analitos em estudo serão quantificados;

XXIV- matriz substituta: matriz que substitui a matriz biológica das amostras em estudo;

XXV- métodos bioanalíticos: métodos analíticos utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas;

XXVI- métodos cromatográficos: métodos que empregam cromatografia para separar o analito de outros componentes da amostra e quantificá-lo;

XXVII- padrão de calibração: matriz à qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito, utilizado para construir a curva de calibração;

XXVIII- padrão interno (PI): substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo;

XXIX- precisão: proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz;

XXX- seletividade: capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra;

XXXI- solução primária: solução preparada a partir de substância química de referência;

XXXII- solução de trabalho: solução preparada a partir da diluição da solução primária;

XXXIII- substância química de referência caracterizada: substância de referência caracterizada por meio de ensaios adequados, devidamente validados e documentados, possuindo alto grau de pureza e uniformidade;

XXXIV- substância química de referência farmacopeica: substância estabelecida e distribuída por farmacopéias ou instituições oficiais autorizadas, possuindo alto grau de pureza e uniformidade;

XXXV- validação: confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos;

XXXVI- validação parcial: realização de parte dos ensaios da validação total em decorrência de modificação no método bioanalítico validado, visando demonstrar a manutenção do desempenho e confiabilidade do método; e

XXXVII- validação total: realização de todos os ensaios de validação de um método bioanalítico.

## CAPÍTULO II DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 3º Para moléculas passíveis de análise por métodos cromatográficos, estes devem ser a primeira escolha.

Parágrafo único. Na hipótese do caput deste artigo, caso não seja utilizado um método cromatográfico, deve ser apresentada justificativa técnica.

Art. 4º Deve ser utilizado PI sempre que aplicável.

§ 1º Para métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas, deve ser utilizado, preferencialmente, PI marcado com isótopo estável.

§ 2º O uso de PI pode ser dispensado desde que justificado tecnicamente.

Art. 5º Os ensaios podem ser ajustados ou modificados quando utilizadas técnicas alternativas, devendo-se atender os fundamentos desta Resolução.

Art. 6º Antes da implementação de um método bioanalítico, deve ser realizada validação total.

§ 1º A validação deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme as especificações de cada ensaio.

§ 2º O estudo de estabilidade de longa duração pode ser concluído após a análise das amostras em estudo, desde que iniciado antes da análise da primeira amostra.

Art. 7º A interferência de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra, nicotina, cafeína e outros possíveis interferentes deve ser avaliada sempre que necessário.

Art. 8º A possibilidade de conversão de um metabólito no composto original durante os procedimentos da análise deve ser avaliada e controlada sempre que necessário.

Art. 9º Sempre que ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado, deve ser realizada validação parcial ou total, de acordo com a relevância da modificação.

Parágrafo único. Quando o impacto da modificação for desconhecido, deve ser realizada a validação total.

Art. 10. Devem ser utilizadas, preferencialmente, substâncias químicas de referência farmacopeica.

Parágrafo único. Substâncias químicas de referência caracterizadas podem ser admitidas, desde que haja:

I - documentação emitida pelo fabricante contendo as seguintes informações:

- a) nomenclatura (denominação comum brasileira ou denominação comum internacional);
- b) nº CAS;
- c) nome químico;
- d) sinonímia;
- e) fórmula molecular e estrutural;
- f) peso molecular;
- g) forma física;
- h) propriedades físico-químicas;
- i) perfil de impurezas; e
- j) cuidados de manipulação e conservação; e

II- laudo analítico emitido pelo fabricante comprovando:

- a) identidade;
- b) teor; e
- c) validade ou data de reteste.

CAPÍTULO III  
DOS ENSAIOS DE VALIDAÇÃO  
Seção I  
Seletividade

Art. 11. Devem ser analisadas amostras da matriz biológica obtidas de, no mínimo, 6 (seis) fontes distintas.

§ 1º Quando a matriz biológica for plasma, devem ser empregadas 4 (quatro) amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

§ 2º Quando a matriz biológica for sangue total, devem ser empregadas 5 (cinco) amostras normais e uma lipêmica.

§ 3º Quando forem utilizadas outras matrizes biológicas, suas características devem ser avaliadas e testadas.

Art. 12. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ.

§ 1º As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do LIQ.



§ 2º As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI.

Art. 13. Caso uma ou mais amostras analisadas apresentem interferência acima dos limites estabelecidos no art. 12, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes distintas devem ser testadas.

Parágrafo único. Caso uma ou mais amostras do segundo grupo apresentem interferência acima dos limites estabelecidos no art. 12, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

#### Seção II Efeito residual

Art. 14. Devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do LSQ.

§ 1º Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ.

§ 2º As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ.

§ 3º As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI.

Art. 15. Se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas.

#### Seção III Efeito matriz

Art. 16. Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

§ 1º Quando a matriz biológica for plasma, devem ser analisadas 8 (oito) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas.

§ 2º Quando a matriz biológica for sangue total, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas, sendo 4 (quatro) normais e 2 (duas) lipêmicas.

§ 3º Quando outras matrizes biológicas forem utilizadas, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas.

§ 4º Em estudos conduzidos em pacientes, que apresentem alguma alteração nas características da matriz biológica, deve-se empregar esta matriz específica neste ensaio.

Art. 17. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}}$$

Art. 18. O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (quinze por cento).

Parágrafo único. Caso o CV dos FMNs relativos a todas as amostras de plasma seja superior a 15% (quinze por cento) devido ao resultado discrepante das amostras hemolisadas, novo CV dos FMNs sem estas amostras pode ser calculado e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas.

Art. 19. Amostras em estudo com grau de hemólise superior ao grau de hemólise aprovado neste teste não poderão ser analisadas.

Art. 20. Caso a metodologia bioanalítica não permita a avaliação do efeito matriz conforme descrito acima, deve ser aplicado procedimento alternativo.

#### Seção IV Curva de calibração

Art. 21. Devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 (seis) amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI.

Parágrafo único. As amostras da curva de calibração devem ser inicialmente adicionadas do padrão do analito e do PI e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que serão submetidas as amostras em estudo.

Art. 22. A curva de calibração deve ser construída utilizando-se a mesma matriz proposta para o estudo.

Art. 23. Deve ser apresentada justificativa científica para a faixa de concentração contemplada pela curva de calibração.

Art. 24. Deve ser apresentada a equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito.

§ 1º As respostas das amostras branco e zero não devem ser utilizadas na construção da equação.

§ 2º Deve ser adotado preferencialmente o modelo matemático mais simples, geralmente o linear.

§ 3º Caso seja proposto um modelo não linear, deve ser demonstrado matematicamente que o modelo linear não é adequado.

§ 4º Para modelos não lineares devem ser incluídas no mínimo 8 (oito) amostras de diferentes concentrações na curva de calibração.

§ 5º Caso a variância do erro não seja constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva.

§ 6º A equação da curva não deve incluir padrões de calibração que não atendam aos critérios de aprovação.

§ 7º Quando um padrão de calibração não for aprovado, a curva de calibração deve ser recalculada sem este padrão.

§ 8º Quando um padrão de calibração atender aos critérios de aprovação, este não deve ser excluído da equação da curva.

Art. 25. Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios:

I - desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e

II - desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

Art. 26. A curva de calibração deve atender aos seguintes critérios para ser aprovada:

I - no mínimo 75% (setenta e cinco por cento) dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; e

II - no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.

#### Seção V Precisão

Art. 27. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão intercorridas).

§ 1º Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 5 (cinco) concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

§ 2º O ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

Art. 28. A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

§ 1º O CV da precisão intracorrída e intercorridas deve ser calculado com base em todos os valores obtidos.

§ 2º Caso o CV não atenda aos limites dispostos no caput, o ensaio deverá ser repetido.

#### Seção VI Exatidão

Art. 29. A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (exatidão intercorridas).

§ 1º Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 5 (cinco) concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

§ 2º O ensaio de exatidão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

Art. 30. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

§ 1º A exatidão intracorrída e intercorrídas deve ser calculada com base em todos os valores obtidos.

§ 2º Caso o CV não atenda aos limites dispostos no caput, o ensaio deverá ser repetido.

#### Seção VII Estabilidade do analito em matriz biológica

Art. 31. Deve ser demonstrada a estabilidade do analito na matriz biológica por meio dos seguintes estudos:

I - estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento;

II - estabilidade de curta duração;

III- estabilidade de longa duração; e

IV- estabilidade pós-processamento.

Art. 32. As condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo.

Art. 33. Os estudos de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras de matriz biológica adicionadas de soluções do analito, PI e o mesmo anticoagulante a ser usado nas amostras em estudo.

Art. 34. Devem ser empregadas no mínimo 3 (três) amostras de CQB e CQA, as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio aplicáveis.

Parágrafo único. Devem ser empregadas apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de  $\pm 15\%$  do valor nominal.

Art. 35. A concentração das amostras deve ser determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada.

Art. 36. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Parágrafo único. Todas as concentrações obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

#### Subseção I Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Art. 37. As amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por no mínimo 12 (doze) horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente.

§ 1º Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento por, no mínimo, 12 (doze) horas, e assim sucessivamente, quantificando-se o analito nas amostras após o último ciclo.

§ 2º O número de ciclos de congelamento e descongelamento deve ser igual ou maior ao número de ciclos a que serão submetidas as amostras em estudo.

#### Subseção II Estabilidade de curta duração

Art. 38. As amostras do estudo de estabilidade de curta duração devem ser processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o método bioanalítico, por tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo.

Subseção III  
Estabilidade de longa duração

Art. 39. As amostras devem ser processadas e analisadas após serem armazenadas por período que exceda o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última.

Parágrafo único. A temperatura utilizada no estudo de estabilidade deve reproduzir a temperatura a que forem armazenadas as amostras em estudo.

Subseção IV  
Estabilidade pós-processamento

Art. 40. As amostras devem ser processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo.

§ 1º O período deve ser superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa.

§ 2º Caso seja realizado algum armazenamento além do auto-injetor, deve ser comprovada a estabilidade nessas condições.

Seção VIII  
Estabilidade do analito e PI em solução

Art. 41. Deve ser demonstrada a estabilidade do analito e do PI em, no mínimo, 3 (três) amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração por tempo superior ao período de uso ou armazenamento das mesmas.

§ 1º As soluções devem ser analisadas após serem mantidas sob as mesmas condições a que serão submetidas as soluções durante seu uso e armazenamento.

§ 2º A estabilidade das soluções primária e de trabalho deve ser analisada por meio de uma diluição apropriada levando-se em consideração a faixa de medição do detector.

§ 3º A média das respostas instrumentais provenientes das soluções em estudo deve ser comparada com a média daquelas obtidas utilizando-se soluções recém preparadas do analito e do PI.

§ 4º Caso seja empregado um isótopo estável como PI, não é necessária a realização do estudo de estabilidade em solução do mesmo, desde que comprovada a ausência de reações de troca de isótopos nas condições do estudo de estabilidade.

Art. 42. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas.

Parágrafo único. Todas as respostas instrumentais obtidas devem ser incluídas no cálculo da média.

Seção IX  
Métodos em que a matriz biológica isenta de analito não está disponível

Art. 43. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada pela comparação das inclinações de, no mínimo, 6 (seis) curvas de adição padrão em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo um nível basal do analito) e da curva padrão em solução ou matriz substituta.

§ 1º O método é considerado seletivo se as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes.

§ 2º Deve ser definido previamente um modelo estatístico para comparação das inclinações.

Art. 44. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, os ensaios de validação da curva de calibração, exatidão e efeito residual podem ser realizados utilizando padrões de calibração e CQs em solução ou matriz substituta, desde que atendido ao disposto no art. 43.

Art. 45. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, os ensaios de validação de precisão e estudos de estabilidade devem ser realizados na mesma matriz biológica das amostras em estudo.

Parágrafo único. Os estudos de estabilidade devem ser realizados de acordo com um dos procedimentos a seguir:

I - comparação das concentrações obtidas das amostras recém-preparadas com as obtidas das mesmas amostras após o período de estabilidade em estudo; ou

II - comparação com os valores nominais, desde que a matriz seja previamente analisada e o nível basal do analito completado a fim de atingir as concentrações do CQB e CQA.

#### CAPÍTULO IV CRITÉRIOS DE APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO

Art. 46. O método aplicado à análise das amostras em estudo deve ser o mesmo método validado, incluindo a utilização do mesmo anticoagulante, técnica de extração e condições analíticas.

Art. 47. Cada corrida analítica das amostras em estudo deve conter:

I - curva de calibração;

II - amostras de CQB, CQM e CQA; e

III - amostras em estudo de um ou mais voluntários do estudo.

§ 1º Todas as amostras devem ser processadas como um único lote.

§ 2º Em estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa, todas as amostras de um mesmo voluntário devem ser analisadas numa mesma corrida, com exceção das amostras de reanálise.

§ 3º O número de amostras de CQB, CQM e CQA a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras em estudo e não deve ser inferior a 6 (seis) CQs, sendo uma duplicata de cada concentração.

§ 4º No caso de corridas de reanálise com amostras diluídas, devem ser incluídas amostras de CQD.

§ 5º As amostras de CQB, CQM, CQA e CQD devem ser distribuídas entre as amostras em estudo de forma balanceada na corrida analítica, sempre em igual número de replicatas de cada concentração.

§ 6º Caso a curva de calibração contemple uma faixa de concentração muito ampla em comparação com a concentração de todas as amostras dos voluntários, um controle de qualidade adicional deve ser incluído na corrida analítica dos voluntários, para que pelo menos dois CQs estejam dentro da faixa de concentrações medidas.

Art. 48. Devem ser consideradas apenas as concentrações quantificadas entre o LIQ e o LSQ.

§ 1º Se os padrões de calibração relativos ao LIQ ou LSQ forem reprovados, o LIQ ou LSQ para esta corrida analítica podem ser considerados os próximos padrões de calibração aprovados.

§ 2º Amostras de concentrações superiores ao LSQ devem ser diluídas e reanalisadas.

§ 3º Concentrações abaixo do LIQ devem ser reportadas como <LIQ.

Art. 49. Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% (sessenta e sete por cento) do total de CQs e no mínimo 50% (cinquenta por cento) dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação aos seus respectivos valores nominais.

Art. 50. A exatidão média e a precisão dos CQs de todas as corridas aprovadas (exatidão e precisão intercorridas) devem ser calculadas para cada nível de concentração.

Parágrafo único. Caso a exatidão média ou a precisão intercorridas extrapole 15% (quinze por cento), as causas devem ser investigadas e justificadas, podendo acarretar rejeição dos dados.

Art. 51. Para aprovação da corrida analítica, sua curva de calibração deve atender aos critérios definidos nos arts. 24, 25 e 26, I.

Parágrafo único. Devem ser aprovados, no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, conforme os critérios estabelecidos no art. 25.

Art. 52. Quando a matriz biológica isenta do analito não estiver disponível, para a corrida analítica das amostras em estudo, devem ser utilizados padrões de calibração e CQs na mesma matriz empregada na validação.

## CAPÍTULO V REANÁLISE

Art. 53. As amostras em estudo devem ser reanalisadas quando:

I - apresentarem concentração acima do LSQ;

II - apresentarem concentração entre o LIQ e o padrão de calibração adjacente, considerando a situação prevista no art. 48, § 1º;

III - apresentarem problemas analíticos que impossibilitem ou invalidem a quantificação; ou

IV - apresentarem resposta do analito acima do LIQ em amostras do tempo pré-dose, amostras de grupo placebo e amostras de grupo controle.

Art. 54. Em estudos de bioequivalência/ biodisponibilidade relativa, não devem ser realizadas reanálises por motivos farmacocinéticos.

Art. 55. Não devem ser realizadas reanálises de padrões de calibração e CQs.

Art. 56. Os procedimentos relativos à reanálise devem estar pré-estabelecidos em procedimento operacional padrão.

#### CAPÍTULO VI DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 57. Esta resolução revogará a Seção Métodos Bioanalíticos do Anexo da Resolução - RE 899, de 29 de maio de 2003 e alínea "d" do Item 2 do Anexo da Resolução - RE 1170, de 19 de abril de 2006 em de 1º de dezembro de 2012.

§ 1º As empresas já podem adequar seus procedimentos de acordo com esta Resolução sem prejuízo da necessidade de observância da data referida no caput deste artigo.

§ 2º Até a data de 1º de dezembro de 2012 as empresas poderão protocolar a documentação ainda de acordo com a RE 899/2003 ou poderão optar por apresentar a documentação conforme previsto nesta Resolução.

§ 3º Na hipótese de optar por apresentar a documentação de acordo com esta Resolução, antes do prazo obrigatório, a aprovação do estudo dependerá da adequação integral na forma desta Resolução.

Art. 58. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

JAIME CESAR DE MOURA OLIVEIRA



**ANEXO B - NOTA TÉCNICA 04/2014****ANVISA**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**NOTA TÉCNICA 04/2014**

Orientações a respeito do artigo 7º, da Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012: Ensaio a serem realizados quando houver a administração de fármacos concomitantes durante estudos de Biodisponibilidade Relativa / Bioequivalência.

---

Coordenação de Equivalência Terapêutica - CETER

Gerência Geral de Medicamentos - GGMED

Superintendência de Medicamentos - SUMED

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

**ANVISA**

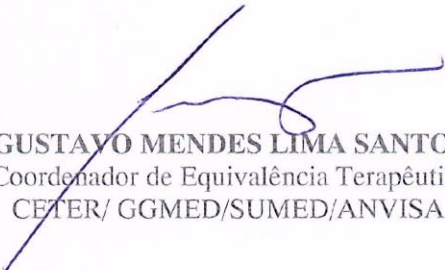
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**NOTA TÉCNICA Nº 04/2014/CETER/GGMED/SUMED/ANVISA-MS**

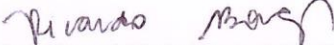
Orientações a respeito do artigo 7º, da Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012: Ensaios a serem realizados quando houver a administração de fármacos concomitantes durante estudos de Biodisponibilidade Relativa / Bioequivalência.

1. Esta Nota Técnica traz orientações a respeito do artigo 7º da Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012.
2. Estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência (BD/BE) que utilizam fármacos concomitantes (medicamentos eventuais e comedição) ou em que voluntários fizeram uso de substâncias possivelmente interferentes (tais como cafeína ou nicotina) devem ter suas amostras analisadas somente após avaliação dos possíveis efeitos analíticos.
  - 2.1. Medicamentos eventuais e comedição cujos fármacos são de ação no trato gastrointestinal e que não necessitam de estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência, conforme estabelecido pela Lista 3 (disponível na página da Anvisa), não necessitam de avaliação dos possíveis efeitos analíticos.
3. Esta avaliação deve ser feita no momento da validação do método analítico e deve contemplar os testes de seletividade e efeito matriz com e sem os possíveis interferentes.
  - 3.1. Caso seja utilizado padrão interno deuterado, a avaliação deve contemplar apenas o teste de seletividade com e sem os possíveis interferentes.
4. A seletividade deve ser realizada conforme descrito na Seção I e os possíveis interferentes devem ser adicionados considerando seus respectivos  $C_{máx}$ .
5. O efeito matriz deve ser realizado conforme descrito na Seção III e adicionalmente devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de um pool com todos os possíveis interferentes e PI, ou cada um destes isoladamente.
  - 5.1. Quando a matriz biológica for plasma, devem ser analisadas 8 (oito) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolizadas, devendo ser as mesmas utilizadas na análise do fármaco empregado no estudo.
  - 5.2. Quando a matriz biológica for sangue total, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais e duas lipêmicas, devendo ser as mesmas utilizadas na análise do fármaco empregado no estudo.
  - 5.3. Quando outras matrizes biológicas forem utilizadas, devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas, devendo ser as mesmas utilizadas na análise do fármaco empregado no estudo.

- 5.4. Em estudos conduzidos em pacientes, que apresentem alguma alteração nas características da matriz biológica, deve-se empregar esta matriz específica.
- 5.5. Para cada amostra deve ser obtido o FMN, conforme citado no artigo 17 da RDC 27/2012.
- 5.6. A(s) mesma(s) amostra(s) (mesma(s) área(s) obtida(s)) em solução utilizada(s) no cálculo do efeito matriz do fármaco empregado no estudo deve(m) ser utilizada(s) para o cálculo do FMN dos possíveis interferentes.
- 5.7. O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (quinze por cento).
- 5.8. Caso o CV das amostras de pool com todos os possíveis interferentes e PI, for superior a 15%, a análise individual de cada interferente deve ser realizada para identificar qual especificamente está causando tal variação.
- 5.9. Após a identificação de qual possível interferente está causando o efeito matriz, deve ser identificado se o CV dos FMNs relativos a todas as amostras de plasma foi superior a 15% (quinze por cento) devido ao resultado discrepante das amostras hemolisadas, neste caso, novo CV dos FMNs sem estas amostras pode ser calculado e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas.
6. Caso durante a etapa clínica haja a administração de medicações eventuais que não foram contempladas nos testes de seletividade e efeito matriz da validação, conforme esclarecido nesta nota técnica, deve ser realizada uma covalidação, onde estes testes devem ser realizados com essas medicações antes do início da etapa analítica do estudo.
7. Esta nota técnica entra em vigor a partir de 11 de outubro de 2014. Todos os estudos em que a etapa analítica ainda não tiver sido iniciada até essa data devem se adequar ao disposto antes da análise das amostras dos voluntários.



**GUSTAVO MENDES LIMA SANTOS**  
Coordenador de Equivalência Terapêutica  
CETER/ GG MED/SUMED/ANVISA



**RICARDO FERREIRA BORGES**  
Gerente Geral de Medicamentos  
GGMED/ANVISA