

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



Thais de Sousa Rolim

**Desenvolvimento e Validação de Método para Quantificação do Fármaco Antimalárico  
Cloroquina no Plasma e Passagem Transplacentária em Ratos**

Rio de Janeiro

2021

Thais de Sousa Rolim

**Desenvolvimento e Validação de Método para Quantificação do Fármaco Antimalárico Cloroquina no Plasma e Passagem Transplacentária em Ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten.

Coorientador(a): Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Development and Validation of a Method for Quantifying the Antimalarial Drug Chloroquine in Plasma and Transplacental Passage in Rats.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

R748d Rolim, Thais de Sousa.  
Desenvolvimento e validação de método para quantificação do fármaco antimalárico cloroquina no plasma e passagem transplacentária em ratos / Thais de Sousa Rolim. -- 2021.  
63 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.  
Coorientador: Davyson de Lima Moreira.  
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Cloroquina. 2. Gravidez. 3. Feto. 4. Antimaláricos.  
5. Cromatografia. 6. Farmacocinética. 7. Ratos. 8. Validação. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.9362

Thais de Sousa Rolim

**Desenvolvimento e Validação de Método para Quantificação do Fármaco Antimalárico Cloroquina no Plasma e Passagem Transplacentária em Ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 02 de julho de 2021.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Gabriela Rodrigues de Souza  
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof. Dra. Carla Junqueira Moragas Tellis  
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Coorientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2021

A todos aqueles que acreditam e fazem ciência,  
este trabalho é dedicado a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus orientadores Dr. Francisco Paumgartten e Dr. Davyson Moreira por terem me aceitado como aluna, pelos ensinamentos e por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço a minha família por sempre me incentivar a estudar e a perseguir os meus sonhos, em especial ao meu avô Walterdes Sousa, por ter me criado tão questionadora.

Agradeço a minha mãe, Mônica Lima, por nunca me fazer desistir de estudar.

Agradeço ao meu pai, Marcelo Rolim, por ter me incentivado a cada dia para continuar na pesquisa.

Agradeço ao meu companheiro, Jean Brito, por me apoiar durante todo o processo.

Agradeço a todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental pelo carinho, conversas jogadas fora e ideias compartilhadas. Agradeço em especial a Rose, por dispor do seu tempo para colher as amostras de sangue/plasma para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço aos meus amigos do curso de Mestrado que compartilharam comigo frustrações, choros e alegrias, mas acima de tudo, obrigada pelas boas risadas e companhia das minhas amigas: Larissa Coelho, Lorena Viannay e Nicolle Martins, sem vocês o mestrado não seria o mesmo.

Agradeço aos meus amigos de fora do meio acadêmico, por sempre acreditarem e torcerem por mim e, principalmente, por sempre estarem a favor da ciência apesar de todas as circunstâncias.

Agradeço a CAPES pelo financiamento dado a mim para que esse projeto pudesse ser realizado.

Agradeço, por fim, a ENSP, do corpo docente a coordenação, pela oportunidade e por todo o conhecimento que me foi dado durante o tempo de curso.

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.  
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”.*  
HIPÓCRATES (460 a.C.-377 a C.)

## RESUMO

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina usada para profilaxia e tratamento de malária desde 1947. Embora o uso extensivo e irracional tenha resultado na seleção de linhagens de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, este fármaco ainda ocupa posição de destaque no arsenal terapêutico disponível para enfrentamento da malária, particularmente fora da África, em países onde os parasitas predominantes são o *P.vivax*, *P.ovale* e *P.malariae*. A cloroquina e o seu derivado hidroxilado hidroxiclороquina integram a Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde, e foram reposicionados para tratamento de condições inflamatórias e autoimunes como a artrite reumatoide, e o lúpus eritematoso, em virtude do moderado efeito imunossupressor. A amebíase hepática (mas não a intestinal) é outra indicação da cloroquina. A farmacocinética da cloroquina, ou seja a Absorção, Distribuição, Metabolização e Eliminação, foi estudada nos últimos 70 anos sendo em linhas gerais muito bem estabelecida. Algumas lacunas relativas à cinética desta 4-aminoquinolina antimalárica, entretanto persistem para serem devidamente preenchidas por estudos experimentais e clínicos. Entre estas, destacam-se a falta de investigações mais completas sobre a farmacocinética na gravidez e transferência materno-fetal do medicamento e metabólitos. A modulação dos parâmetros farmacocinéticos da cloroquina pela infecção (malária) e durante a evolução da gravidez é aspecto particularmente importante que não foi ainda abordado por estudos experimentais e clínicos. O objetivo do trabalho realizado no âmbito desta Dissertação foi desenvolver e validar método cromatográfico para quantificação da cloroquina no plasma, que possa ser empregado para estudo futuro das alterações farmacocinéticas desta 4-aminoquinolina na gravidez, incluindo a transferência através da placenta para o embrião-feto, e modulação destas alterações pela malária. O método analítico foi testado em diferentes colunas cromatográficas e composição de fase móvel em equipamento Shimadzu Nexera XR. O sangue heparinizado foi submetido à separação do plasma. Esse material biológico foi testado com diferentes métodos de precipitação de proteínas para recuperação do analito no sobrenadante. A metodologia foi validada de acordo com a RDC 166/2017 da ANVISA. Para testar o desempenho do método desenvolvido neste trabalho, realizamos experimento preliminar sobre a passagem da cloroquina do sangue (plasma) materno para o fetal na gravidez a termo de ratas (dia 21 de gravidez) após administração oral (cânula gástrica) de dose única de 50 mg/kg de peso. Os resultados mostraram que as concentrações da cloroquina no plasma fetal, 120 min após o tratamento materno, correspondem a aproximadamente 70% dos níveis que foram registrados no plasma das mães. Essa extensa transferência materno-fetal é consistente com o que havia sido observado em alguns poucos estudos clínicos usando o sangue de cordão umbilical por ocasião do parto à termo. Em conclusão, um método para quantificação da cloroquina no plasma, sensível, robusto, e de baixo custo foi desenvolvido e validado e poderá ser empregado futuramente para estudos das alterações da cinética desse fármaco antimalárico causadas pela infecção e gravidez, incluindo a passagem através da placenta para o compartimento embrião-fetal.

Palavras-chave: Cloroquina. Gravidez. Feto. Antimalárico. Cromatografia. Validação.



## ABSTRACT

Chloroquine is a 4-aminoquinoline drug that has been used to prevent and treat malaria since 1947. Although the extensive and irrational drug use had selected chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*, this quinoline-derived medication has still a prominent place in the drug armamentarium available to tackle malaria infections, particularly outside Africa, in countries where the disease is predominantly caused by *P.vivax*, *P.ovale* and *P.malariae* parasites. Chloroquine and its hydroxylated derivative hydroxychloroquine are listed by WHO among the most essential medicines and were repositioned to treat inflammatory and auto-immune conditions such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus due to their mild to moderate immunosuppressive properties. Liver amebiasis (but not the intestinal one) is another possible indication for chloroquine. The pharmacokinetics of chloroquine, that is, the Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination, was studied in the past 70 years and is generally well established. A few knowledge and research gaps regarding chloroquine kinetics, however, remain to be fulfilled by experimental and clinical studies. One of these research gaps refers to the pharmacokinetics in pregnancy and the maternal-fetal transfer of the parent drug and its metabolites. The modulation of chloroquine kinetic parameters by malaria infection and pregnancy, for instance, is a relevant research question that has not yet been adequately addressed by experimental and clinical studies. The main objective of this research work was to develop and to validate a chromatographic method to quantify chloroquine in plasma samples. The developed method should be suitable for studying changes of chloroquine kinetic in pregnancy, including the transfer across placenta to the embryo or fetus and the modulation of these changes by maternal malaria. The analytical method was tested on different chromatographic columns and mobile phases composition in Shimadzu Nexera XR equipment. Heparinized blood was subjected to plasma separation. This biological material was tested with different protein precipitation methods for analyte recovery in the supernatant. The methodology was validated in accordance with ANVISA RDC 166/2017. To test the performance of the method, we carried out a preliminary experiment on the transfer of chloroquine from maternal to fetal blood plasma at term pregnancy (pregnancy day 21) in rats treated orally (gavage) with a single dose of chloroquine (50 mg/kg bw). Results showed that concentrations of chloroquine in fetal plasma were approximately 70% the levels found in the maternal plasma 120 min after drug administration. The extensive mother-fetus transfer of chloroquine noted in this study was consistent with findings from a few previous clinical investigations that analyzed chloroquine in umbilical cord blood samples taken at childbirth. In conclusion, a sensitive, robust and cost-effective chromatographic method for quantification of chloroquine in the plasma was developed and validated. This method proved to be suitable for further studies of alterations of chloroquine kinetics induced by infection in pregnancy including the transfer across the placenta from the mother to the embryo / fetus.

Keywords: Chloroquine. Pregnancy. Fetus. Antimalarial. Chromatography. Validation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	(A) Fórmulas estruturais plana (B) Tridimensional da Cloroquina.....	15
Figura 2 -	(a) Fórmulas estruturais (a) 4-aminoquinolina, (b) cloroquina, (c) hidroxicloroquina.....	18
Figura 3 -	Separação de misturas por cromatografia em coluna.....	23
Figura 4 -	Componentes de um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência.....	24
Figura 5 -	Colunas para aplicação em CLAE (a) e em CLUE (b), para efeitos de comparação.....	25
Figura 6 -	Esquema que representa quando validar um método analítico.....	28
Figura 7 -	Esquema de precipitação de proteínas de amostras biológicas para análise por CLAE.....	31
Figura 8 -	Curva típica relacionando concentrações plasmáticas versus tempo após administração oral do fármaco e reflete o conjunto dos processos ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção).....	33
Figura 9 -	Frasco de difosfato de cloroquina usado como padrão, cedido por Farmanguinhos.....	37
Figura 10 -	Equipamento ShimadzuNexera®, Laboratório de Toxicologia Ambiental, ENSP-FIOCRUZ.....	38
Figura 11 -	Cromatograma do padrão cloroquina em água a uma concentração de 50 µg/mL.....	42
Figura 12 -	(A) Cromatograma do extrato de plasma (branco); (B) Sobreposição do cromatograma do padrão cloroquina 50 µg/ mL em água com o cromatograma do extrato de plasma (branco).....	43
Figura 13 -	Cromatograma de solução aquosa de cloroquina a 250 ng/ mL = limite de quantificação.....	44
Figura 14 -	Cromatograma de solução aquosa de cloroquina a 125 ng/ mL = limite de identificação.....	44
Figura 15 -	Curvas analíticas obtidas para a cloroquina em três dias diferentes.....	45
Figura 16 -	Relação entre a concentração de CQ de no plasma materno e no plasma dos fetos da respectiva ninhada (cada grupo ou pool contém o sangue 2 a 4 de uma mesma ninhada).....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros definidos para análise de cloroquina no plasma.....	42
Tabela 2 -	Parâmetros avaliados para obtenção da robustez.....	46
Tabela 3 -	Resultados do teste de robustez para cloroquina.....	46
Tabela 4 -	Precisão inter dia.....	47
Tabela 5 -	Precisão intra-dia.....	47
Tabela 6 -	Exatidão da cloroquina em seis concentrações diferentes.....	48
Tabela 7 -	Recuperação da cloroquina em duas concentrações diferentes.....	48
Tabela 8 -	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) da cloroquina (50 mg/kg peso corporal, PO) determinadas no plasma das ratas grávidas e no plasma de seus fetos à termo (GD21).....	49
Tabela 9 -	Métodos de quantificação da Cloroquina (em diversas matrizes) por CLAE/CLUE na literatura.....	51

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Possíveis detectores para CLAE.....	24
Quadro 2 - Principais diferenças entre separação analítica por CLAE e por CLUE.....	26
Quadro 3 - Parâmetros necessários para validar um método segundo a Resolução 166 da Anvisa de 2017.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

CQ – Cloroquina

LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico

LQ – Limite de quantificação

LD – Limite de detecção

ZIKV – vírus zika

CHIKV - vírus Chikungunya

CLAE – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

CLUE - Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência

ACN – Acetonitrila

FM – Fase móvel

FE – Fase estacionária

ABS – Absorbância

AUC – Área sobre a curva

$K_2HPO_4$ - Fosfato de potássio dibásico

ADME – Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção

COVID 19 – doença causada pelo vírus SARS-CoV-2

VCF - Velocidade de captação do fármaco

Vd – Volume aparente de distribuição

Cp – Concentração plasmática

FDA - Food and Drug Administration, Agência Americana para Alimentos e Medicamentos

C1 – Compartimento central (sangue)

C2 - Compartimento periférico

$k_{12}$ - Taxa de transferência de C1 para C2

$k_{21}$ - Taxa de transferência de C2 para C1

Q - Velocidade do fluxo sanguíneo através do órgão

CA - Concentração do fármaco que entra no órgão

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

mL – Mililitro

kg- Kilograma

mg - Miligrama

min – Minuto

$^{\circ}\text{C}$  – Grau Celsius

CV – Coeficiente de variação

M – Média

DP – Desvio-padrão

tR – Tempo de retenção

nm - Nanômetro

% - Porcentagem

$K_e$  - constante de velocidade de eliminação

L – Litro

pH – potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1	<b>CLOROQUINA</b> .....	18
2.1.1	<b>Farmacocinética da cloroquina</b> .....	20
2.1.2	<b>Efeitos adversos</b> .....	21
2.1.3	<b>Estudos da farmacocinética da cloroquina na gravidez e passagem transplacentária</b> .....	22
2.2	<b>CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA E DE ULTRA EFICIÊNCIA</b> .....	22
2.2.1	<b>Validação de métodos analíticos</b> .....	27
2.2.2	<b>Análises em matrizes biológicas</b> .....	30
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
4.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	36
4.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	36
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	37
5.1	<b>PADRÃO CLOROQUINA</b> .....	37
5.2	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO</b> .....	37
5.2.1	<b>Solução padrão</b> .....	37
5.2.2	<b>Desenvolvimento do método analítico</b> .....	38
5.2.3	<b>Validação do método analítico</b> .....	39
5.3	<b>ANIMAIS</b> .....	39
5.3.	<b>Procedência do animal</b> .....	39
5.3.2	<b>Acasalamento dos animais</b> .....	40
5.3.3	<b>Tratamento</b> .....	40
5.3.4	<b>Cesariana</b> .....	40
5.3.5	<b>Coleta das amostras de sangue e obtenção do plasma</b> .....	41
5.4	<b>FARMACOCINÈTICA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PASSAGEM TRANSPLACENTÀRIA NA GRAVIDEZ À TERMO (DG21)</b> .....	41

6	<b>RESULTADOS</b> .....	42
6.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	42
6. 1. 1	<b>Seletividade</b> .....	43
6. 1.2	<b>Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)</b> .....	44
6. 1.3	<b>Linearidade (curva analítica)</b> .....	45
6. 1.4	<b>Robustez</b> .....	45
6. 1.5	<b>Precisão e exatidão</b> .....	47
6. 1.6	<b>Recuperação</b> .....	48
6.2	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TRANSFERÊNCIA CLOROQUINA DO PLASMA DAS MÃES PARA O PLASMA FETAL AO FINAL DA GRAVIDEZ (GD 21).....	49
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
7. 1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	50
7.2	FARMACOCINÉTICA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PASSAGEM TRANSPLACENTÁRIA.....	52
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

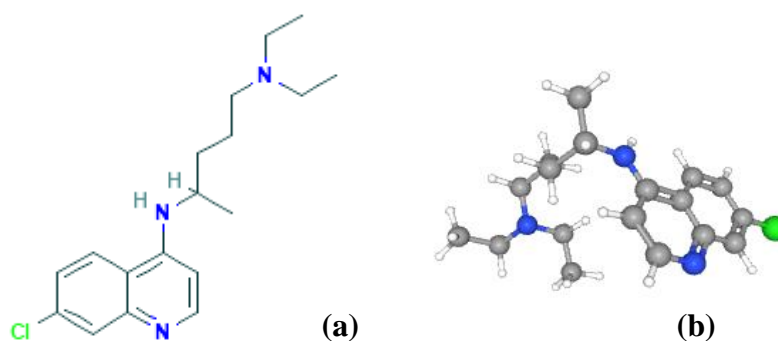


## 1. INTRODUÇÃO

A cloroquina (Figura 1) é um medicamento que tem sido amplamente utilizado no tratamento e profilaxia da malária, sendo frequentemente administrado à pacientes grávidas (WHITE *et al.*, 2014; OLAFUYI; BADHAN, 2019). Além do uso como antimalárico, essa 4-aminoquinolina foi reposicionada para o tratamento de condições inflamatórias de etiologia autoimune como lúpus eritematoso e artrite reumatoide (CHOPRA; SALUJA; VENUGOPALAN, 2014). O emprego da cloroquina (e hidroxicloroquina) foi ampliado também para quadros reumáticos secundários às infecções virais, como as causadas pelo arbovírus chikungunya (USHIDA e TROLEZI, 2004; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; CAO, SHETH e MYSOREKAR, 2018). A suposta atividade antiviral da cloroquina e hidroxicloroquina, evidenciada em alguns ensaios *in vitro*, não foi confirmada por estudos clínicos randomizados e controlados que apontaram ser para esta 4-aminoquinolina ineficaz para esta finalidade terapêutica.

Em 2020, a cloroquina ficou em evidência, quando pesquisadores franceses sugeriram, a partir de estudos precários e com óbvias limitações metodológicas, que este fármaco 4-aminoquinolinico fosse útil para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2. Porém, estudos posteriores adequadamente planejados não conseguiram comprovar o efeito terapêutico desse fármaco para pacientes infectados com SARS-CoV-2 (COLSON *et al.*, 2020; PAUMGARTTEN *et al.* 2020). A cloroquina (CQ) é uma 4-aminoquinolina (figura 1), e seus sais são solúveis em água e rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal (AUGUSTIJNS e VERBEKE, 1993).

Figura 1: (a) Fórmulas estrutural plana (b) tridimensional da cloroquina.



(PUBCHEM, [s.d.]), acesso em 04/12/19.

Embora a farmacocinética da cloroquina tenha sido estudada nos últimos 70 anos, algumas questões ainda não foram suficientemente esclarecidas. Entre estas, destacam-se a falta de investigações mais completas sobre a cinética da cloroquina na gravidez e transferência materno-fetal do medicamento e metabólitos. A modulação dos parâmetros farmacocinéticos da cloroquina pela infecção (malária) e durante a evolução da gravidez é aspecto particularmente importante que merece ser mais bem investigado por estudos experimentais e clínicos.

Farmacocinética é a disciplina científica que estuda a movimentação (cinética) ou transferência de um fármaco e seus produtos de biotransformação no organismo, incluindo a absorção (entrada ou passagem para o compartimento central, ou circulação sistêmica), distribuição por diferentes tecidos ou compartimentos, metabolismo ou biotransformação e eliminação ou excreção, processos biológicos que de forma concisa são referidos pelo acrônimo ADME para Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação (GIBALDI, 1991; STORPIRTIS *et al.*, 2011).

A gravidez produz alterações fisiológicas no organismo materno que podem modificar a farmacocinética (*e.g.*, volume de distribuição, eliminação, ligação às proteínas plasmáticas, “clearance” ou depuração metabólica e excreção renal, entre outras) e a farmacodinâmica e, portanto, os efeitos terapêuticos e adversos (toxicidade) do medicamento que, em última análise, dependem da concentração alcançada pelo fármaco ou metabólito ativo no sítio de ação. Em virtude das alterações farmacocinéticas, podem ser necessários ajustes do regime de doses quando os medicamentos são usados para tratar mulheres grávidas (COSTANTINE, 2014; FEGHALI *et al.* 2015). Outra questão de relevância na clínica, quando se trata da farmacoterapia de mulheres grávidas, é a eventual transferência do medicamento ou metabólitos para o compartimento embrionário-fetal (passagem transplacentária) e suas consequências para o conceito.

Em que pese à relevância da questão para o uso de medicamentos durante a gestação, estudos da cinética de fármacos em mulheres grávidas, e da passagem através da placenta, são relativamente pouco frequentes e/ou incompletos. Este é o caso de alguns medicamentos antimaláricos entre os quais a cloroquina. Para realizar estudos com esse objetivo, quer experimentais ou clínicos, é preciso, obviamente, dispor de métodos analíticos, sensíveis, confiáveis e, se possível, de baixo custo e viáveis na maioria dos laboratórios.

Métodos analíticos sensíveis, confiáveis e robustos que permitam quantificar o fármaco de interesse e seus metabólitos em matrizes biológicas, entre as quais o sangue, plasma, soro, urina e tecidos, são fundamentais para realização de estudos farmacocinéticos

pré-clínicos e clínicos, determinação da biodisponibilidade relativa e bioequivalência de formulações e monitoramento terapêutico dos pacientes.

Situado neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal, desenvolver método analítico a ser empregado no estudo da farmacocinética da cloroquina em animais e seres humanos. Uma das questões que necessita ser aprofundada é, até que ponto as alterações fisiológicas que ocorrem na gravidez afetam a cinética da cloroquina. Além disso, é importante esclarecer, também, até que ponto a malária em mulheres grávidas interfere com a disposição do fármaco e a sua transferência através da placenta para o concepto. Para contribuir para futuras investigações com esses objetivos, uma nova metodologia analítica foi desenvolvida e validada, por Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) associada à Detector de Ultravioleta em Rede de Diodos (DAD-UV).

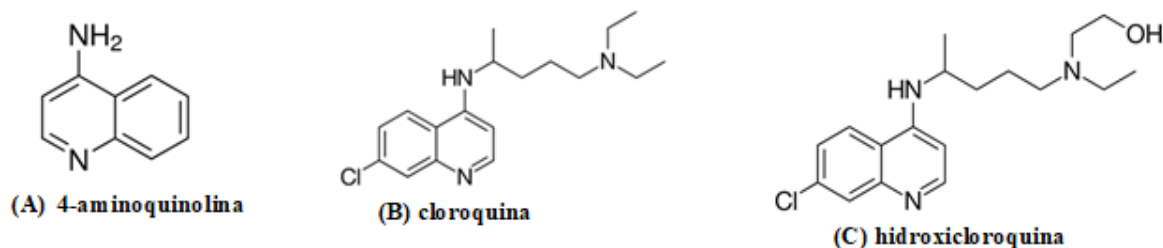
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. CLOROQUINA

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina (figura 2) sintetizada pela primeira vez em 1934 que sucedeu a quinina, como medicamento antimalárico de escolha, reconhecidamente efetivo e seguro, na segunda metade do século passado, uso esse que continua amplo até os dias atuais.

Pode-se afirmar que nas primeiras décadas após a segunda grande guerra, o eficiente controle dos mosquitos transmissores (anofelinos), combinado ao tratamento em massa dos indivíduos com malária foi responsável por um dos mais extraordinários sucessos da saúde pública, reduzindo drasticamente a incidência e as mortes causadas por essa protozoose. Em algumas regiões do mundo a malária praticamente deixou de existir como grave problema de saúde pública e a OMS, criada em 1946, passou a antever a erradicação da malária através da Campanha de Erradicação da Malária (CEM). Os sérios problemas ambientais causados pelo uso em larga escala e descuido do DDT, não apenas em controle de vetores, mas também na agricultura, aliado ao aparecimento de cepas de *Plasmodium falciparum* – parasita responsável pelas formas mais letais da doença - resistentes à cloroquina, principalmente na África, fez com que esse sonho fosse abandonado ainda na segunda metade do século XX (COOPER E MAGWERE, 2007; JENSEN E MEHLHORN, 2009; WHITE *et al.*, 2014; OLAFUYI e BADHAN, 2019).

Figura 2: (a) Fórmulas estruturais (a) 4-aminoquinolina, (b) cloroquina, (c) hidroxicloroquina



O desenvolvimento de antimaláricos derivados da quinolina, composto orgânico aromático heterocíclico cuja fórmula química é  $C_9H_7N$ , remonta ao uso tradicional pelos índios Quechua dos Andes (Equador, Peru, Bolívia) da casca da árvore cinchona (*Cinchona officinalis*) para diferentes fins medicinais, incluindo o tratamento de tremores e calafrios (febre). Levada pelos jesuítas espanhóis para a Europa, a casca da cinchona passou a ser utilizada neste continente como medicamento fitoterápico para tratar a febre e a malária. No século XIX (1820) a quinina, alcaloide derivado da quinolina, foi extraída de extratos da casca da cinchona passando a ser utilizada com as mesmas finalidades terapêuticas do fitoterápico (SÁ, 2011; GOSS, 2014; GACHELIN, *et al.*, 2017)

Após a síntese, na década de 1930, por químicos da Bayer, a cloroquina (4-aminoquinolina) foi usada pelos alemães (“AfrikaKorps”) durante a guerra no norte da África onde caiu em poder dos americanos que, alguns anos mais tarde, a submetem a ensaios clínicos e constataram a sua notável eficácia e segurança para prevenção e tratamento da malária. A cloroquina foi introduzida como medicamento antimalárico em 1947 (SÁ, 2011).

Acredita-se que o principal mecanismo de ação antimalárica da cloroquina e outros derivados da quinolina (e.g., hidroxicloroquina, quinina, amodiaquina) envolva a inibição da cristalização do grupo heme  $\ominus$  e a formação (por biomineralização) do pigmento hemozoína no interior dos vacúolos digestivos do parasita. Dentro das hemácias, os plasmódios catabolizam a hemoglobina do hospedeiro para obter aminoácidos e energia. Enquanto o heme liberado pela digestão da hemoglobina é nocivo para o parasita, o produto da cristalização (hemozoína) não é tóxico. Liberado, o heme-livre gera espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo que resultam na morte do parasita. Estudos recentes revelaram uma diversidade surpreendente de interações moleculares quinolina-heme e sugerem que mesmo fármacos derivados da quinolina, estreitamente relacionados estruturalmente, podem agir ao nível da farmacodinâmica molecular de modo diferente o que pode ter relevância em termos do desenvolvimento de resistência pelos parasitas (WOLFRAM, 2017).

Embora o uso intensivo e por vezes irracional tenha resultado na seleção de cepas de *P.falciparum* resistentes a cloroquina, e por conseguinte limitando a sua utilidade nos cenários onde isso ocorreu, não há notícia do aparecimento de resistência a esta 4-aminoquinolina entre outras espécies do gênero *Plasmodium*, incluindo o *P.vivax*, que é o principal agente etiológico da malária no Brasil (DESAI *et al.*, 2018; KATEERA *et al.*, 2016; SALMAN *et al.*, 2017; OLAFUYI e BADHAN, 2019).

Pela inegável importância no tratamento da malária, particularmente a doença causada por *P.vivax*, *P.ovale* e *P.malariae*, tanto a cloroquina quanto a hidroxicloroquina, molécula derivada resultante da hidroxilação da cloroquina, integram a lista de medicamentos essenciais da OMS.

- **Propriedades físico-químicas:**

A CQ (Nome IUPAC: *(RS)-N'-(7-chloroquinolin-4-yl)-N,N-diethyl-pentane-1,4-diamine*; Número CAS: 54-05-7) é uma substância orgânica heterocíclica da classe das quinolinas, ou seja é uma aminoquinolina, possuindo um grupo amino na posição 4 no anel (4-aminoquinolina, figura 2). Seus sais são solúveis em água, com pH variando de 5,2 a 5,6, sendo praticamente insolúvel em benzeno e em etanol (THE MERCK, 2006, DRUGBANK, 2020).

A fórmula estrutural é  $C_{18}H_{26}ClN_3$ , sendo o peso molecular 319,872. O medicamento é geralmente dispensado sob a forma de comprimidos de difosfato de cloroquina ( $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ ), e apresenta duas formas polimórficas com pontos de fusão variando entre 193 e 218 °C, dependendo da sua forma polimórfica (DRUGBANK, 2020).

### 2.1.1. Farmacocinética da cloroquina

Em seres humanos, a CQ é rapidamente e extensamente absorvida a partir da luz do tubo gastrointestinal quando administrada por via oral, sendo alta a biodisponibilidade (70 a 80%) da dose ingerida. A absorção da CQ administrada por injeção intramuscular ou subcutânea também é muito rápida e extensa. A distribuição do fármaco é ampla por diferentes tecidos do organismo, sendo as maiores concentrações encontradas no fígado, baço, rins, pulmão, células sanguíneas. O volume aparente de distribuição ( $V_d$ ) é elevado, superior a 100L/kg, podendo chegar a 200 - 800 L/kg, quando calculado a partir de concentrações plasmáticas, e de 200 L/kg, quando estimado de níveis no sangue total (em que as concentrações são 5 a 10 vezes mais elevadas). (SWEETMAN, 2005)

Cerca de, 60% da cloroquina presente encontra-se ligada a proteínas plasmáticas no sangue. A eliminação ocorre tanto por via renal quanto hepática. No fígado a cloroquina sofre oxidação (desalquilação) sendo rapidamente convertida em desetilcloroquina e bisdesetilcloroquina, que são metabólitos farmacologicamente ativos e atingem 40 e 10% das

concentrações de cloroquina, respectivamente. As reações de fase 1 de desalquilação da cloroquina são catalisadas por enzimas do complexo citocromo P450, entre as quais as da subfamília CYP3A e a isoforma CYP2D6 (que exibe polimorfismo genético na população). As concentrações plasmáticas de cloroquina e desetilcloroquina declinam lentamente ao longo do tempo, com meias-vidas de eliminação da ordem de 20 a 60 dias, ou seja, tanto o fármaco administrado (cloroquina) quanto o metabólito podem ser detectados na urina meses após a administração de uma dose única (LIMBRID, 2003; SWEETMAN, 2005; KRISHNA, WHITE, 2008; WHO, 2010; DRUGBANK, 2020).

### 2.1.2. Efeitos adversos

Embora tenham o potencial de causar amplos efeitos adversos a cloroquina e a hidroxicloroquina são consideradas seguras para tratamento da malária, tendo em vista o inegável benefício terapêutico, ou seja, o fato de que, para essa indicação, os benefícios alcançados sobrepujam amplamente os riscos de eventos adversos. Entre os efeitos indesejados mais comuns que têm sido associados às essas 4-aminoquinolinas antimaláricas, podem ser citados, a ocorrência de náuseas, vômitos, cólicas abdominais, cefaleia, visão embaçada, diarreia, zumbido (“*tinnitus*”), fraqueza muscular, falta de ar, coceira, gosto metálico na boca, alterações mentais (confusão mental, alucinações) e de humor (↔) e outros. Os problemas mais graves e que podem resultar em morte e sequelas importantes, são o prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma, o bloqueio atrioventricular, as arritmias, e parada cardíaca (↔) e a retinopatia associada a cloroquina que pode ser irreversível e causar cegueira (SCHERBEL & SCHUCHTER, 1957; TANENBAUM & TUFFANELLI, 1980; LACAVA, 2010; CABRAL *et al.*, 2019).

A segurança de qualquer medicamento depende da indicação terapêutica, frequência e duração do uso, e no caso da cloroquina / hidroxicloroquina, pode-se afirmar que o risco de uso para indicações não aprovadas (*off label*) é inaceitável e deve ser fortemente desaconselhado (PAUMGARTTEN *et al.*, 2020).

### 2.1.3. Estudos da farmacocinética da cloroquina na gravidez e passagem transplacentária

No âmbito deste trabalho, o método para quantificação de cloroquina no plasma foi desenvolvido e validado para uso posterior em estudos das alterações da farmacocinética da cloroquina ao longo da gravidez e investigação da passagem transplacentária desta 4-aminoquinolina. O objetivo maior a ser futuramente alcançado em investigações com o uso do método descrito neste trabalho, será não apenas verificar em que medida a cloroquina é transferida do organismo materno para o embrião/feto, mas também esclarecer se a infecção (malária) afeta a eliminação (*clearance*) do organismo materno e a passagem transplacentária.

É conhecido que infecções virais, parasitárias e bacterianas podem modular a expressão e atividade de enzimas de biotransformação de fármacos e outros xenobióticos. As profundas modificações e adaptações fisiológicas que o organismo materno sofre durante a evolução da gravidez também tem reflexos em termos dos parâmetros farmacocinéticos, tais como volume distribuição (*Vd*) e *clearance* de vários medicamentos e podem implicar na necessidade de ajustes da posologia recomendada (PATIL, 2017)

Por outro lado, é imperioso tratar a malária na gravidez. A malária durante a gravidez, principalmente em gestantes primíparas e secundíparas, evolui de forma muito mais grave do que em mulheres não grávidas, com elevada morbimortalidade materna e consequências adversas para o feto. Além disso, a malária é um fator de risco para desfechos adversos da gravidez tais como prematuridade, baixo peso ao nascer para a idade gestacional, morbimortalidade neonatal e até mesmo a transmissão vertical mãe-filho da infecção, embora a infecção congênita seja rara (LLANOS *et al.*, 2009; DESAI *et al.*, 2018; KATEERA *et al.*, 2016; SCHREIBER, 2017, BELIZNA, 2015; LIMPER *et al.*, 2018).

## 2.2. CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA E DE ULTRA EFICIÊNCIA

A Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das principais ferramentas analíticas no desenvolvimento e produção de medicamentos, sendo uma forma adequada para separação de substâncias orgânicas neutras, espécies iônicas e até macromoléculas (ETTRE, 2000; KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). Com alta

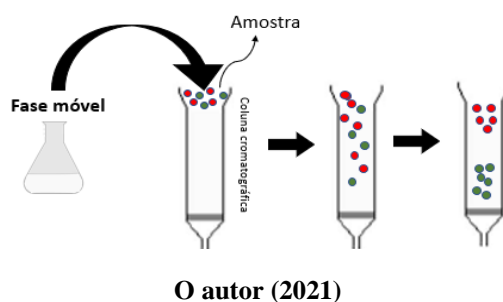


seletividade, é uma técnica capaz de boa separação de componentes não voláteis de misturas complexas, sendo muito aplicada em indústrias, sejam alimentícias ou farmacêuticas.

A técnica consiste na separação de misturas através de duas fases: *estacionária* (FE) e *móvel* (FM) (figura3). A *fase móvel* deve ser um líquido inerte com alto grau de pureza no qual deve ser capaz de dissolver o analito, enquanto a *fase estacionária* deve ser, também, inerte, no qual é constituída geralmente com sílica ( $\text{SiO}_2$ ), podendo ser modificada ou não, resistentes a altas pressões e temperaturas (ETTRE, 2000).

As colunas possuem diferentes tamanhos (centímetros), diâmetros internos (milímetro), e tamanhos de partícula (micrometro), podendo estar acondicionadas, ou não, em um forno para controle da temperatura durante a etapa de separação (DEGANI *et al.*, 1998; PERES, 2002). Os detectores devem apresentar uma faixa de aplicação ampla, sendo que os modelos espectrais, como os de ultravioleta-visível são os mais utilizados (PERES, 2002; MALDANER & JARDIM, 2012).

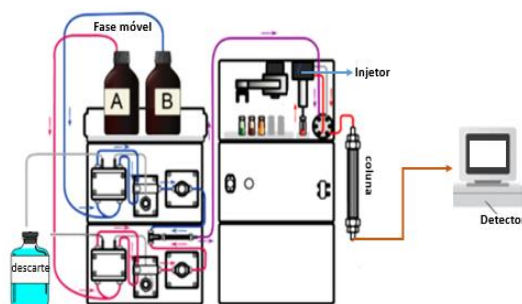
Figura 3: Separação de misturas por cromatografia em coluna aberta



Os principais componentes da CLAE são bomba, injetor, coluna, detector e registrador. A figura4 apresenta um esquema com esses componentes:

- a) *bomba*: responsável por impulsionar a fase móvel e amostra através da coluna para ser analisada;
- b) *injetor*: responsável por injetar a amostra no sistema de separação;
- c) *coluna cromatográfica*: responsável por realizar a separação das substâncias contidas na amostra;
- d) *detector*: responsável pela detecção, pode ser de vários tipos como descritos no Quadro 1;
- e) *registrador*: responsável por registrar as substâncias presentes eluídas.

Figura 4: Componentes de um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência



O Autor (2021), adaptado de <https://www.nacientifico.com.br/>

Quadro 1: Possíveis detectores para CLAE

Detector	Limite de detecção (ng)
Ultravioleta visível (UV-vis)	0,1-1
Espectrometria de massas	0,1-1
Fluorescência	0,0001-0,01
Fotoionização	< 0,0001
Índice de refração	100-1000

Elaborado a partir de PERES, 2002 e MALDANER & JARDIM, 2012

A CLAE permite que se utilize até quatro eluentes como FM nos equipamentos modernos, desde que sejam próprios para cromatografia. As FMs podem ser programadas em dois modos diferentes: (1)**isocrática** ou (2)**gradiente**. Enquanto no modo isocrático a composição das FMs permanece constante durante todo o tempo de análise, o modo gradiente utiliza-se de proporções e porcentagens diferentes ao longo do tempo. Esse fato confere boas vantagens, incluindo melhor separação e simetria dos sinais, porém pode diminuir a vida útil da coluna e exige um tempo de reequilíbrio na FM inicial ao final da corrida cromatográfica.

Com a busca por separações cada vez mais rápidas e eficientes, com melhora da resolução, partículas cada vez menores têm sido empregadas nas colunas cromatográficas que também evoluíram para diâmetros internos menores. Essas partículas, além de menores que 2  $\mu\text{m}$ , conservam também uma maior homogeneidade de distribuição de forma. Surge, então, a Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Eficiência (CLUE - português ou UPLC - inglês). Os equipamentos passaram por uma reformulação no sistema de bombeamento, já que colunas com menor diâmetro e menor tamanho de partícula requerem pressões muito maiores para impulsionarem a FM, em comparação aos sistemas de CLA Econvencionais (MALDANER,

2009). O equipamento de CLUE (bombas, injetores e detectores) pode operar em pressões acima de 100 Mpa (o equivalente a  $1 \times 10^{-6}$  bar) (MALDANER & JARDIM, 2012). Portanto, a cromatografia em fase líquida de ultra eficiência é uma das técnicas mais recentes de separação, e se baseia em princípios semelhantes aos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência, porém, utiliza colunas com fases estacionárias que possuem partículas menores, com menor diâmetro interno e comprimento reduzido (5 a 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 a 2,1 mm e com partículas menores ou iguais a  $2 \mu\text{m}$ ). O uso destas colunas, juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel, proporcionam um aumento da resolução e uma diminuição do tempo de análise, o que é fundamental em quantificação (figura 5).

Os equipamentos para realização da CLUE possuem uma faixa de volume de injeção de 0,1 - 50  $\mu\text{L}$ . Teoricamente, a detecção desse sistema, comparada com a de um sistema que opera em CLAE, é cerca de 2 - 3 vezes maior, dependendo do tipo de detector usado e do diâmetro das conexões do sistema. Uma vez que as duas técnicas são sistemas de separação que tem por base os mesmos princípios, torna-se relevante a transferência de um método desenvolvido e validado por CLAE para um de CLUE, o que permitirá o emprego de uma **menor quantidade de amostra**, um **menor fluxo de FM**, e um **menor tempo de análise** (MALDANER & JARDIM, 2012). Segundo os estudos de Veuthey e colaboradores (2007) a transferência de um método de CLAE para CLUE é viável, desde que determinados fatores sejam considerados, como o modo de eluição empregado no método de separação desenvolvido, além da fase estacionária, que deve ser similar à do método original.

Figura 5: colunas para aplicação em CLAE (a) e em CLUE (b), para efeitos de comparação.



Imagens retiradas da cmscientifica.com, acessado em 04/04/2021

Na transferência de um método de separação, o principal fator é a razão entre o volume extra-coluna (volume entre injetor/coluna, coluna/detector e dentro do detector) e o volume total (o volume encontrado na extra-coluna e na coluna), que não pode ultrapassar 10%, em nenhuma das 2 técnicas cromatográficas (CLAE x CLUE). Quando os resultados obtidos nas duas técnicas não são compatíveis, obtém-se um alargamento do sinal cromatográfico. As modificações normalmente solicitadas são: (i) capacidade de trabalhar em pressões muito altas, (ii) volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), (iii) celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, (iv) melhoramento no sistema de controle de dados, (v) colunas resistentes para trabalharem em altas pressões e com baixo volume morto, (vi) injetores com precisão na faixa de volumes pequenos. Os parâmetros a serem otimizados devem ser o volume de injeção e a vazão da FM (MALDANER & JARDIM, 2012; VEUTHEY *et al.*, 2007). No quadro a seguir (Quadro 2) encontram-se as diferenças entre os métodos de separação por CLAE e por CLUE:

Quadro 2: Principais diferenças entre separação analítica por CLAE e por CLUE.

	CLAE	CLUE
TAMANHO DA PARTÍCULA	10,5 a 3,5 $\mu\text{m}$	< 2 $\mu\text{m}$
FAIXA DE PRESSÃO	< 6000 psi	9000 – 15000psi
FLUXO DE FASE MÓVEL	>0,5 <3 mL/min	< 1 $\mu\text{L}$
DIÂMETRO COLUNA	> 4,5mm	1-3 mm

Elaborado a partir de Maldaner & Jardim (2012)

Atualmente, muitos trabalhos já foram realizados empregando separação por CLUE, com detectores ópticos (UV-Vis) e associado à espectrometria de massas (EM) (MALDANER & JARDIM, 2012). Por exemplo, Dongre e colaboradores (2008) fizeram a validação de um método para a determinação de primaquina e suas impurezas usando colunas com partículas de 1,7  $\mu\text{m}$  em um sistema de CLUE-UV, e colunas com partículas de 5  $\mu\text{m}$  em um sistema de CLAE-UV.

A validação de um método analítico é necessária para garantir resultados confiáveis e interpretáveis sendo, normalmente, padronizadas, tanto para separações por CLAE quanto por CLUE.

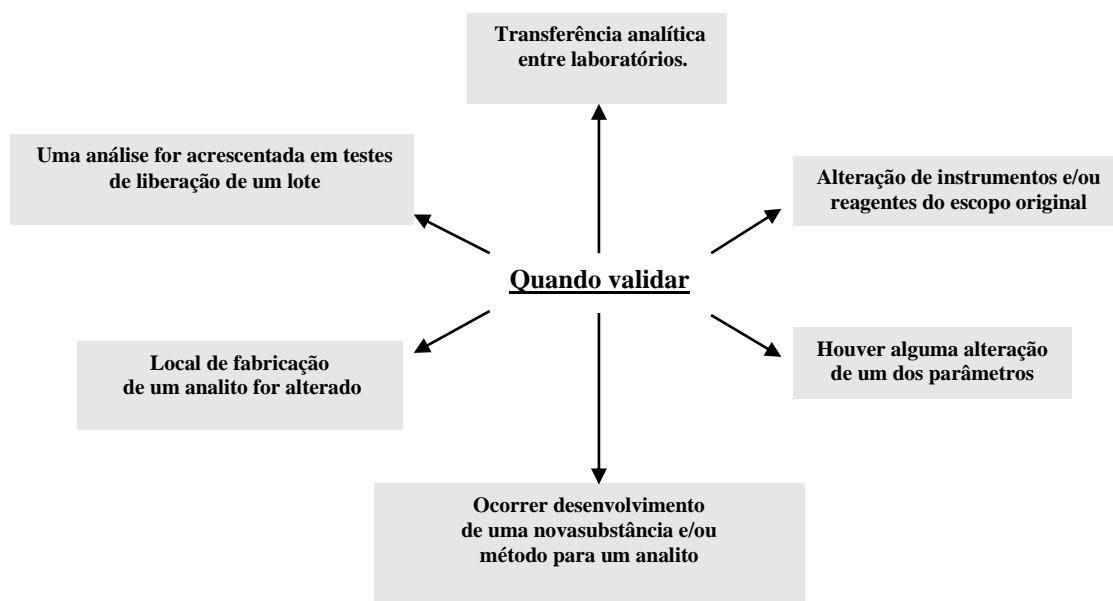
### 2.2.1. Validação de métodos analíticos

Todo método analítico deve ser avaliado segundo a sua eficiência, sendo de grande importância demonstrar que são confiáveis e que tenham precisão, por testes de comparação e rastreabilidade. Uma boa metodologia analítica consegue produzir resultados reprodutíveis e de qualidade. O processo de validação tem como objetivo demonstrar que um método é adequado para uma determinada finalidade, seja ela em nível industrial ou em laboratório de pesquisa.

Validar um método é torná-lo confiável, garantindo que o analito seja analisado da mesma forma, com a mesma qualidade, e dentro dos parâmetros pré-estabelecidos. A validação de um método cromatográfico envolve diferentes etapas de execução, com o propósito de avaliar todas as suas características. É realizado um planejamento estratégico analítico, que **deve** atender a critérios compreendidos em legislações correspondentes à validação de metodologias, com interpretações e variantes diversas. A legislação brasileira para validação analítica de amostras biológicas preconiza as resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualmente em vigor a resolução 166 de 2017 que preconiza a validação de métodos analíticos, que foram inspiradas em diretrizes internacionais (SAKIYAMA, 2018).

A validação deve ser realizada em algumas circunstâncias, como mostrado na figura 6.

Figura 6: Esquema que representa quando validar um método analítico.



O Autor, 2021 (elaborado a partir de RIBANI *et al.* (2004))

Uma validação deve apresentar uma variação de faixa de concentração considerável, além de verificar qual o melhor tipo de amostra para o propósito. A frequência com a qual o método será utilizado (um dia apenas de análise; análises muito demoradas; análises que levam semanas) deve ser considerado, pois influencia o tipo de estudo de validação que será aplicado (RIBANI *et al.*, 2004; SAKIYAMA, 2018).

Os parâmetros analíticos (SWARTZ, 1998) ou características de desempenho (THOMPSON, 2002; INMETRO, 2003; ANVISA, 2017) que devem ser avaliados durante uma validação de um método analítico de separação, geralmente são compostos por: *seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez*. Esses parâmetros são definidos no quadro 3 (RIBANI *et al.*, 2004).

A aplicabilidade da validação se dá em diversas áreas, tais como as que envolvem monitoramento e avaliações nas áreas biológicas, área de engenharias, saúde pública, saúde ambiental e no controle da qualidade para a produção e avaliação de medicamentos, alimentos, entre outros produtos (LA ROCA *et al.*, 2007; ANVISA, 2017).

Diante de tais argumentos, conclui-se que uma validação analítica bem planejada e executada irá gerar resultados confiáveis e reprodutíveis.

Quadro 3: Parâmetros necessários para validar um método segundo a Resolução 166 da Anvisa de 2017

<b>Parâmetros de Validação Analítica</b>	<b>Definição (RDC 166 de 2017, ANVISA)</b>
<b>Seletividade</b>	Deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. No caso de ensaios analíticos relacionados à cromatografia, deve-se comprovar que o sinal se apresenta puro, livre de contaminantes.
<b>Linearidade</b>	Mostra a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito. É preconizado que se deve usar 5 concentrações, no mínimo, diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas de forma replicada (em 3 ou mais).
<b>Limite de quantificação (LQ)</b>	Considerado a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do LQ pode ser realizada por meio de método visual da razão sinal/ ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado. A razão sinal/ ruído deve ser no mínimo de 10:1.
<b>Limite de detecção (LD):</b>	Menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém, não quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do LD pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal/ ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado. A razão sinal/ ruído deve ser maior ou igual a 3:1.
<b>Precisão</b>	Avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico validado. Deve ser expressa por meio da repetitividade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio-padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) da série de medições.
	A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o

<b>Exatidão</b>	intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe.
<b>Robustez</b>	Um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas.
<b>Recuperação</b>	Reflete o quanto de um determinado analito é recuperado em relação à quantidade real que está presente na amostra. O estudo consiste na “fortificação” da amostra, através de soluções em diferentes concentrações da substância de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado.

**RDC 166 de 2017 – ANVISA, com modificações.**

### 2.2.2. Análises em matrizes biológicas

A CLAE tem a capacidade de analisar amostras com diversas substâncias, como já dito anteriormente, e tem sido utilizada para determinar componentes presentes em matrizes biológicas como soro, plasma, sangue total, saliva e urina (de OLIVEIRA *et al*, 2008).

Geralmente, o plasma é a matriz mais utilizada para monitorização terapêutica e avaliação farmacológica, no qual a concentração do analito na matriz consegue prover a informação da exposição direta dos tecidos de um fármaco em estudo. O plasma humano corresponde a 55% da proteína albumina além ser composto de eletrólitos, hormônios, lipídeos. Esses componentes podem dificultar a análise de fármacos visto que a grande maioria se liga às proteínas plasmáticas, logo a remoção de interferentes é imprescindível para uma boa análise. Para isso é necessário a utilização de técnicas para a remoção de tais interferentes (ABRAHAM & LUTY 2010; BORDIN *et al.*, 2015).

Uma das técnicas mais comuns é a *precipitação de proteínas* por ser uma prática simples e rápida. Esta técnica consiste na desnaturação das proteínas pela adição de um, ou mais, agentes precipitantes (geralmente ácidos ou bases fortes, solventes orgânicos, temperatura), seguida de uma ação mecânica (agitação, centrifugação) para separação do precipitado e do sobrenadante (fração a ser analisada). Um esquema exemplificando desse processo é apresentado na figura 7. É um método simples, não sendo utilizado processo de extração ou pré-concentração da amostra, entretanto, por ser uma técnica realizada



manualmente,requer um tempo de repouso para precipitação, e o tempo total é longo (BORDIN *et al.*, 2015).

Figura 7: Esquema de precipitação de proteínas de amostras biológicas para análise por CLAE.



O Autor (2021)

Existem, ainda, outras técnicas de separação de analitos de amostras biológicas, como a *extração líquido-líquido* (ELL) e a *microextração líquido-líquido* (MELL), que se baseiam na partição de duas soluções imiscíveis e o analito irá se concentrar em uma delas que será levada à análise;*extração líquido-líquido com salting out*, na qual um sal é adicionado a uma amostra aquosa junto a um solvente orgânico miscível, tornando-o bifásico para auxílio de separação desse solvente com o intuito de melhorar a extração de solventes apolares e, conseqüente recuperação do analito;*extração em fase sólida*(EFS) e *microextração em fase sólida* (MEFS) que se baseiam no princípio de separação por afinidade, no qual empregam-se materiais em colunas capazes de reter as substâncias orgânicas (incluindo o analito) e deixando eluir os inorgânicos, água e proteínas;*extração de gases do espaço vazio(headspace)* acima de uma amostra líquida, que emprega sistemas aquecidos para volatilização do analito de matrizes biológicas, por exemplo, análise de álcool em amostras de sangue(BORDIN *et al.*, 2015).

Dentre alguns estudos com matrizes biológicas e análises por CLAE estão os de separação, determinação e quantificação de fármacos (PAOLETTI *et al.*, 2017; YARIPOUR, S. EBRAHIMI, A. MOHAMMADI, 2020; SIDDIQI *et al.*, 2019), determinação de produtos químicos, como parabens (TARTAGLIA, *et al.*, 2019), substâncias como micotoxinas (OSTERESCH *et al.*, 2017), agrotóxicos como o glifosato (PIMENTA *et al.*, 2020), e vitaminas presentes no organismo humano (BARROSet *al.*, 2010). Um estudo interessante de matrizes biológicas com CLAE é a avaliação da peroxidação lipídica em pacientes com câncer de mama, no qual é realizada uma dosagem plasmática em diversos estágios da doença (CARNEIRO *et al.*, 2010).

Uma área que utiliza muito a CLAE para avaliação em matrizes biológicas é a Toxicologia Forense, na qual o método é utilizado para identificar drogas ilícitas e determinar se *acausa mortis* tem relação com o consumo dessas drogas (CHINCHOLE *et al.*, 2012). As matrizes mais comuns utilizadas nessa área são a urina, cabelo e o sangue (ABRAHAM & LUTY, 2010; CASTRO *et al.*, 2012).

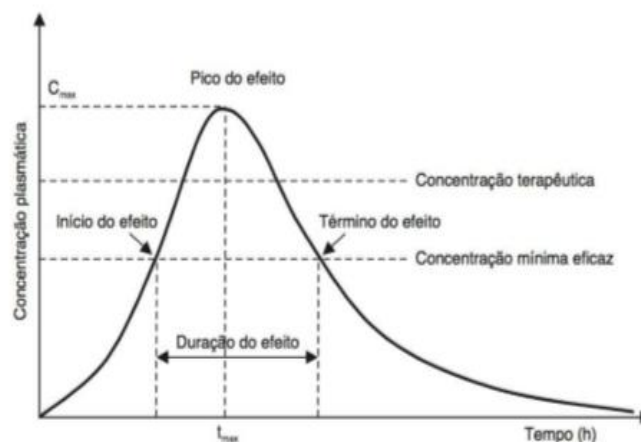
A validação de métodos analíticos em matrizes biológicas segue os mesmos parâmetros estabelecidos pela ANVISA na RDC 166 de 2017, na qual a avaliação do parâmetro da recuperação é feita na matriz. Esse parâmetro é importantíssimo, pois recuperar com eficiência o analito da matriz complexa é fundamental. O cálculo de recuperação é feito por comparação das áreas cromatográficas obtidas na amostra dopada com o analito de interesse (por exemplo, plasma) e submetido ao procedimento de extração e das áreas cromatográficas do analito numa amostra sem passar pela extração (branco). Por exemplo, numa análise de recuperação de CQ, avalia-se o fármaco numa matriz, como o plasma, e o fármaco adicionado a um branco (substâncias usadas na precipitação do analito, somente, além da mesma quantidade de água em detrimento de plasma). As áreas obtidas são relacionadas, sendo a área do analito no branco igual a 100% e a área obtida da análise pós precipitação X%. Se a recuperação estiver próxima a 100% (podendo ter uma variação de 15%) o método pode ser aplicado para a quantificação do fármaco na matriz biológica (CASSIANO *et al.*, 2009; CARMO *et al.*, 2017).

### 3. JUSTIFICATIVA

Como anteriormente comentado, a farmacocinética (*i.e.*, fármaco + cinética) estuda a movimentação de fármacos e metabólitos em sistemas biológicos. Em outras palavras, enquanto a farmacodinâmica é a vertente da farmacologia que se volta para as ações do medicamento no organismo, a farmacocinética investiga o que o organismo faz com ele, como ele se movimenta e é biotransformado para ser eliminado. É claro que a farmacocinética é aspecto crítico tanto para a resposta terapêutica quanto para a ocorrência de eventos adversos (KATZUNG, 2014; ARANCÍBIA, 1992; STORPIRTIS *et al.*, 2011; WAGNER, 1975; RANG&DALE, 2011).

O sangue, o plasma e o soro e, também, a urina são as principais matrizes biológicas utilizadas para estudos farmacocinéticos experimentais e clínicos e monitoramento de medicamentos na prática clínica. A concentração do fármaco no sangue (compartimento central) após a administração ao paciente depende de vários processos que tem lugar no organismo desde a entrada na circulação sistêmica até a eliminação pelo metabolismo (*clearance* metabólico) e excreção renal ou biliar. O gráfico das alterações da concentração no sangue, plasma ou soro, versus tempo pós administração, é uma das formas mais comuns de representar o comportamento cinético de fármacos. Essa representação gráfica das alterações de concentração ao longo do tempo ilustra o resultado dos processos de ADME (figura 8). (RANG&DALE, 2011, REMINGTON, 2014)

Figura 8: Curva típica relacionando concentrações plasmáticas versus tempo após administração oral do fármaco



Fonte: STORPIRTIS, 2011

Na figura 8 estão assinalados alguns parâmetros farmacocinético relevantes como  $C_{max}$  = concentração máxima do fármaco;  $t_{max}$  = latência ou tempo para que o  $C_{max}$  seja atingido. Na fase ascendente da curva a velocidade do processo de absorção a partir da luz do trato gastrointestinal é maior do que a do processo de eliminação, a igualdade da velocidade dos dois processos é alcançada no pico ( $C_{max}$ ) e a partir deste, ou fase descendente da curva, a velocidade de eliminação supera a de absorção do fármaco do organismo.

O detalhamento desses processos dinâmicos ao nível, não só do compartimento central (intravascular), mas também dos demais compartimentos pelos quais se distribui no organismo (que geralmente correspondem a tecidos e órgãos), são feitas em modelos farmacocinéticos preditivos complexos.

Estudos farmacocinéticos são úteis para:

- Pesquisa & Desenvolvimento de novos fármacos, orientando os esquemas de posologia nos estudos clínicos e uso pós-aprovação regulatória;
- Extrapolação entre espécies ou de dados de estudos de segurança em animais (fase pré-clínica) para o homem (ensaios clínicos).
- Desenvolvimento de modelos farmacocinéticos preditivos baseados na fisiologia (PBPK: *PhysiologicallybasedPharmacokineticModels*).
- Estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de diferentes formulações do mesmo fármaco.
- Ajustes racionais de esquemas de doses para pacientes que realizam o uso concomitante de 2 ou mais fármacos que interagem entre si;
- Individualização da posologia para pacientes que apresentam metabolismo diferenciado do fármaco (como deficientes hepáticos e renais); e pertencentes a grupos de metabolizadores rápidos ou lentos (fármaco-genética, ou polimorfismo genético de enzimas de biotransformação)
- Conhecimento do tempo de meia vida( $t_{1/2}$ ) de um fármaco e interpretação de efeitos adversos que ocorrem após certo tempo a partir da administração e início do tratamento.

Estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos, assim como exames úteis para a prática clínica e monitoramento pós comercialização, dependem de métodos analíticos seletivos, sensíveis, robustos, confiáveis e acessíveis para quantificação de fármacos e de seus metabólitos baseados em metodologias, tais como a Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (STORPIRTIS, 2011). A CLAE é a base de muitos métodos amplamente empregados para quantificar fármacos e metabólitos em matrizes biológicas e, conseqüentemente, determinar os parâmetros ADME. Além de desempenhar importante papel no desenvolvimento de novos fármacos, métodos baseados na CLAE possibilitam também aprofundar o conhecimento da cinética daqueles que já estão no mercado.

Diante do exposto e sabendo que a cloroquina (CQ) é um fármaco desenvolvido primariamente como antimalárico, mas que também tem sido redirecionado para o tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide. Além disso, recentemente, a cloroquina e seu derivado hidroxilado, hidroxicloroquina, foram amplamente prescritos (off label) e para tratamento das infecções pelo SARS-CoV-2 (Covid 19), indicação esta não aprovada pelos órgãos regulatórios. Embora testes *in vitro* em cultura de células tenham sugerido potencial atividade antiviral, repetidos estudos clínicos randomizados e controlados mostraram que a cloroquina e a hidroxicloroquina são ineficazes para o tratamento do Covid-19 (PAMGARTTEN *et al.* 2020). Não há também qualquer comprovação clínica de que a cloroquina e hidroxicloroquina sejam úteis para o tratamento de outras infecções virais como as arboviroses dengue e zika. Portanto, em virtude da ampla utilização da cloroquina para indicações aprovadas como a malária e doenças autoimunes, e, também, do amplo uso irracional desse fármaco, ambos envolvendo grande número de mulheres grávidas e/ou em idade reprodutiva, é importante aprofundar o conhecimento sobre a sua farmacocinética na gravidez e passagem da gestante para o concepto. Este estudo é necessário para desenvolver modelos preditivos e estabelecer ajustes dos regimes de doses de modo que os níveis do fármaco e/ou metabólitos ativos alcançados no sangue (soro ou plasma) permaneça no intervalo terapêutico - ou seja concentrações eficazes e seguras, quando o fármaco for usado como medicamento antimalárico ao longo da gravidez.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. GERAL

Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência para quantificar a cloroquina em plasma de roedores para utilização em investigação da farmacocinética desta 4-aminoquinolina na gravidez, incluindo a passagem transplacentária.

### 4.2. ESPECÍFICOS

- ➔ Desenvolver e validar um método analítico por CLUE, seguindo recomendação de normas analíticas estabelecidas pela ANVISA;
- ➔ Quantificar a concentração de cloroquina no plasma de rata não grávida, de rata grávida e de feto após administração de dose única por via oral;
- ➔ Determinar a concentração plasmática da cloroquina concomitantemente na mãe e no feto nos tempos 60 e 120 min após administração oral do fármaco.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. PADRÃO CLOROQUINA

Difosfato de cloroquina (CQDP, peso molecular 515,86), código de registro 61023, (figura 9) foi cedido pelo **Instituto de Tecnologia em Fármacos** da Fiocruz (*Farmanguinhos*) e utilizado para o desenvolvimento e validação do método, assim como para o tratamento dos animais. O cálculo da quantidade usada em todos os experimentos levou em consideração a base livre CQ (peso molecular 319,87) e, portanto, todos os resultados vão ser expressos como concentração da base livre CQ. Por exemplo, para preparo de uma solução aquosa de 10 mg/ mL de CQ expressa em termos de base livre e não do sal, deve-se pesar 16,13 mg do CQDP e diluir em 1 mL de água. Assim, 16,13 mg do sal são equivalentes a 10 mg de CQ base.

Figura 9: Frasco de difosfato de cloroquina usado como padrão, cedido por Farmanguinhos.



### 5.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

#### 5.2.1. Solução padrão

Uma solução estoque (SE) em concentração de 200 µg/ mL de CQ foi preparada por pesagem em balança analítica de precisão e, em seguida, diluída em água ultrapura milliQ (Milipore®), para a obtenção de um volume final de 100 mL, em um balão volumétrico. A SE foi mantida sob refrigeração a -5 °C e ao abrigo da luz. As soluções utilizadas para o

desenvolvimento e validação do método analítico, para a quantificação do fármaco CQ (soluções de trabalho, ST), foram obtidas a partir de diluições seriadas da SE.

### 5.2.2. Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento, validação e análises foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida ShimadzuNexera®, equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AF, forno CTO-20A, detector DAD-UV-VIS APD-20MA, degaseificador DDU20A e controlador CBM-20A. A manipulação dos cromatogramas é feita com uso do programa ShimadzuLabSolutions (figura 10).

A primeira etapa do desenvolvimento do método analítico foi determinar o espectro de absorção da CQ na região do Ultravioleta-Visível e verificar o comprimento de onda de maior absorção.

Os testes iniciais de fase móvel e fase estacionária foram feitos com base em experiência do laboratório em analisar fármacos antimaláricos, e, principalmente, tendo como referência o artigo de Carmo *et al.*, 2017, que desenvolveu e validou um método para análise de primaquina por CLAE.

Figura 10: Equipamento ShimadzuNexera®, Laboratório de Toxicologia Ambiental, ENSP-FIOCRUZ





### 5.2.3. Validação do método analítico

A validação do método de análise da CQ em plasma por CLUE foi realizada conforme a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA n. 166 de 24 de maio de 2017, incluindo os seguintes parâmetros de desempenho analítico:

*Seletividade:* Avaliação da existência de sinais interferentes na janela cromatográfica do analito;

*Linearidade:* obtenção da curva analítica em gráfico de dispersão nas concentrações 150; 25; 12,5; 6,25; 3,00; 1,56 e 0,78 µg/ mL;

*Precisão:* realizada em 3 concentrações diferentes: alta (150 µg/ mL), média (18,75 µg/ mL) e baixa (4,69 µg/ mL), no mesmo dia e em dias diferentes;

*Exatidão:* realizada nas mesmas concentrações da curva analítica;

*Limites de detecção e quantificação:* realizados por diluição seriada a partir da solução de trabalho de CQ;

*Recuperação:* obtido por adição do fármaco em plasma e do fármaco em água, a partir de solução de trabalho em alta concentração (200 µg/ mL) e em concentração média (50 µg/ mL);

*Robustez:* obtida por variação dos parâmetros molaridade do tampão, concentração de acetonitrila da fase móvel, absorvância, marca da ACN, temperatura do forno e fluxo da fase móvel.

## 5.3. ANIMAIS

### 5.3.1. Procedência do animal

Ratos (fêmeas e machos) foram utilizados originários da colônia de animais não consanguíneos (*outbred*) Wistar mantida na FIOCRUZ. Os animais foram fornecidos pelo **Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)** da Fiocruz com idades entre 8 a 10 semanas. As experiências e o manuseio dos animais foram realizados de acordo com o disposto nas diretrizes éticas internacionalmente aceitas e na legislação brasileira de proteção ao bem-estar de animais. Os procedimentos e experiências deste estudo são consistentes com protocolos aprovados pelo Comissão de ética para Utilização de Animais em Pesquisas da Instituição (CEUA-FIOCRUZ).

### 5.3.2. Acasalamento dos animais

Duas ratas virgens foram alojadas em gaiola com um rato macho por um período de 3-4 h. Após este período, as fêmeas foram examinadas para confirmação da cópula, através da verificação da presença de plug vaginal (massa de espermatozoide) e/ou visualização de espermatozoides no lavado vaginal. As fêmeas que copularam (*i.e.*, que apresentavam plug ou espermatozoides no lavado vaginal) foram consideradas grávidas, alojadas em gaiolas individuais e acompanhadas diariamente até o dia 21 de gravidez (DG21) para observação de eventuais alterações comportamentais e clínicas, e evolução ponderal. O dia da cópula é considerado o dia zero (0) da gestação (DG 0). Para realização deste estudo preliminar da passagem transplacentária da CQ foram usadas 5 ratas grávidas.

### 5.3.3. Tratamento

As soluções de CQ em água ultrapura milliQ (Milipore®) foram preparadas no dia do tratamento. As ratas grávidas utilizadas nos estudos foram tratadas por via oral (gavagem) com 50 mg CQ/kg de peso corporal no dia 21 (DG21) de gestação. Digno de nota a respeito da estabilidade da cloroquina é a observação de Zulluagae colaboradores(2014). Esses pesquisadores testaram 3 concentrações de cloroquina (20, 800 e 2000 nM) e verificaram que decorridos 90 dias, os níveis de precisão deste fármaco foram 13, 7 e 6 %, respectivamente.

### 5.3.4. Cesariana

No DG21, as ratas grávidas foram eutanasiadas (leve anestesia seguida por decapitação) e submetidas à cesariana 60 e 120 min após o tratamento com CQ. Ainda no DG21, após a eutanásia seguida da laparotomia, o útero com todo seu conteúdo foi pesado, e os fetos e respectivas placentas foram retirados e pesados.

Os fetos foram identificados individualmente usando uma caneta dermatográfica, examinados, e o número de reabsorções visíveis foi registrado (perdas gestacionais). As placentas foram identificadas, pesadas e armazenadas em congelador (-20°C) para análise posterior se necessário.

### 5.3.5. Coleta das amostras de sangue e obtenção do plasma

No DG21, 60 e 120 min após administração de CQ, amostras de sangue das ratas grávidas foram retiradas da veia lateral da cauda e dos respectivos fetos, por gotejamento gravitacional logo após a eutanásia dos conceptos por decapitação, e transferidas para frascos heparinizados. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 12.000 rcf por 15 min para obtenção do plasma, que foi congelado e mantido em *freezer* a -20°C, até ser submetido à análise, dentro de um prazo máximo de 30 dias.

### 5.4. FARMACOCINÉTICA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PASSAGEM TRANSPLACENTÁRIA NA GRAVIDEZ À TERMO (DG21)

A avaliação preliminar da passagem da CQ através da placenta se deu pela quantificação concomitante dos níveis plasmáticos de CQ nas mães e respectivos fetos (ninhadas), empregando o método por CLUE desenvolvido e validado para esse propósito. Cabe destacar que essa Dissertação apresenta a validação do método no plasma de roedores (ratos) mas é plausível supor que possa ser usado também para plasma humano (mães e sangue do cordão umbilical) no âmbito de um possível desdobramento dessa pesquisa. A validação do método para as demais matrizes biológicas de interesse não pode ser realizada em função da interrupção dos trabalhos devido pandemia de COVID. O material está devidamente acondicionado para que este trabalho possa ser executado no futuro.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA

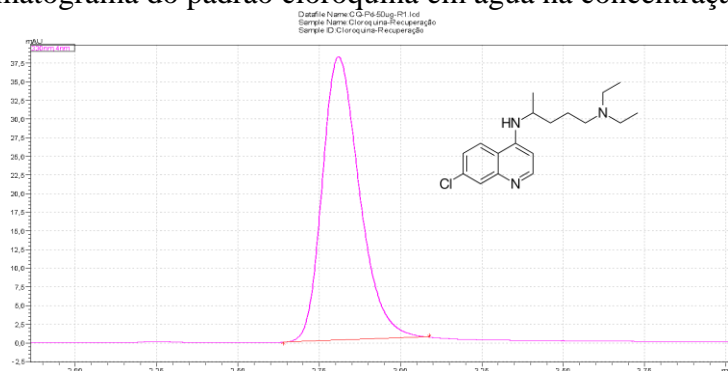
Para o desenvolvimento da metodologia de análise foram realizados testes com solução aquosa do padrão CQ a 50 µg/mL; coluna cromatográfica de sílica modificada com propilciano ou sílica modificada C18; fases móveis compostas de tampão acetato de amônio ou fostato de potássio dibásico (pH 3,0 ou 3,5)/acetonitrila grau HPLC (Tedia, Brasil) em diferentes proporções e em modo isocrático (CARMO *et al.*, 2017). A melhor condição para análise de CQ em solução aquosa, considerando-se simetria de sinal e fator de retenção está descrita na tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros definidos para análise de Cloroquina no plasma

<b>Coluna</b>	Sílica Ascentis Express propilciano ES-CN (75 mm x 2.1 mm i.d. x 2,7 µm tamanho de partícula)
<b>Fase móvel</b>	Mistura de tampão fosfato dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (pH 3,4 com ácido fosfórico 80%)/ acetonitrila 95:5, em modo isocrático de eluição
<b>Temperatura do forno</b>	50 °C
<b>Fluxo de fase móvel</b>	0,25 mL/ min
<b>Deteção</b>	330 nm
<b>Volume de injeção</b>	1 µL

Nessas condições de análise o tempo de retenção (tR) da CQ variou de 2,99 a 3,20 min (Figura 11) e a pressão do equipamento foi registrada em torno de 75 bar. O tempo total de análise foi de 5 min.

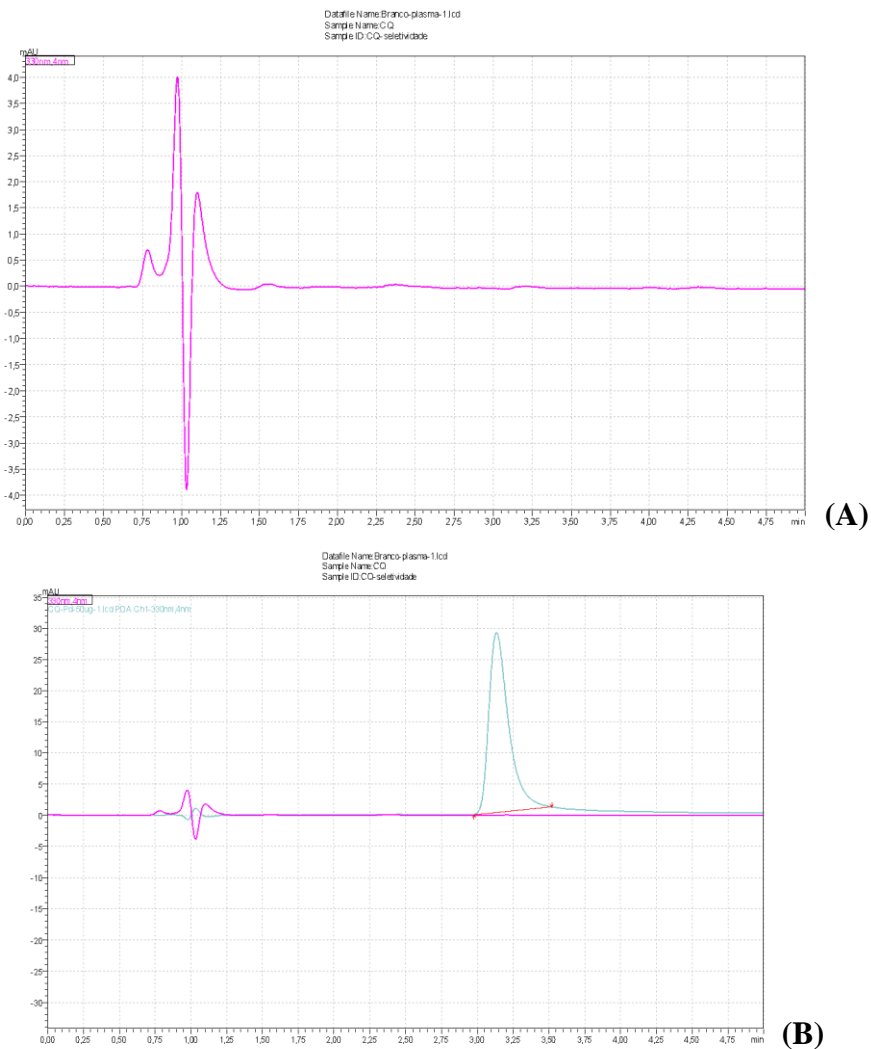
Figura 11. Cromatograma do padrão cloroquina em água na concentração de 50 µg/mL.



### 6.1.1. Seletividade

O método se apresentou seletivo para quantificação de CQ, no qual pode-se observar que na janela de eluição do analito não foram registradas outras substâncias (figura 12, A e B). O parâmetro da seletividade foi confirmado pelo parâmetro da recuperação, tendo esse ficado entre 96 e 101%. Caso outras substâncias co-eluissem com a CQ, a recuperação seria muito maior. Dessa forma, o método é seletivo.

Figura 12: (A) Cromatograma do extrato de plasma (branco); (B) Sobreposição do cromatograma do padrão cloroquina 50 µg/ mL em água com o cromatograma do extrato de plasma (branco).



### 6.1.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LQ e LD foram estabelecidos a partir de diluições sucessivas com a observação da relação sinal/ ruído 10/1 e 3/1, respectivamente (RDC 166/2017). O LQ foi determinado em 250 ng/ mL e o LD em 125 ng/ mL (figuras 13 e 14). Esses limites demonstram que o método é bastante sensível para detecção e quantificação da CQ na escala de nanograma.

Figura 13. Cromatograma de solução aquosa de cloroquina a 250 ng/ mL = limite de quantificação.

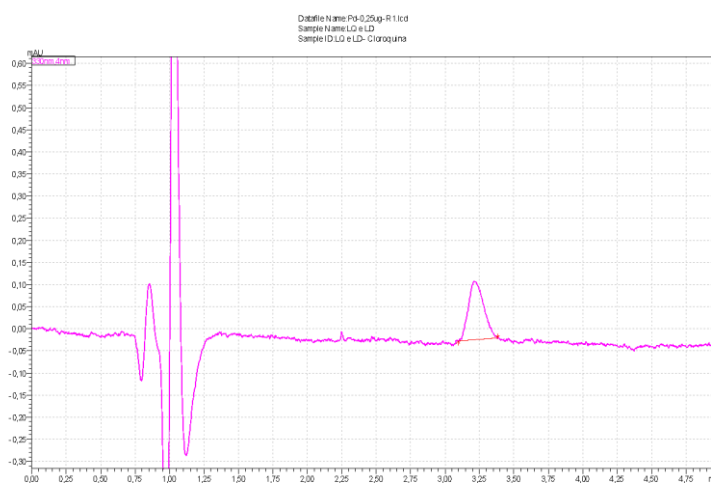
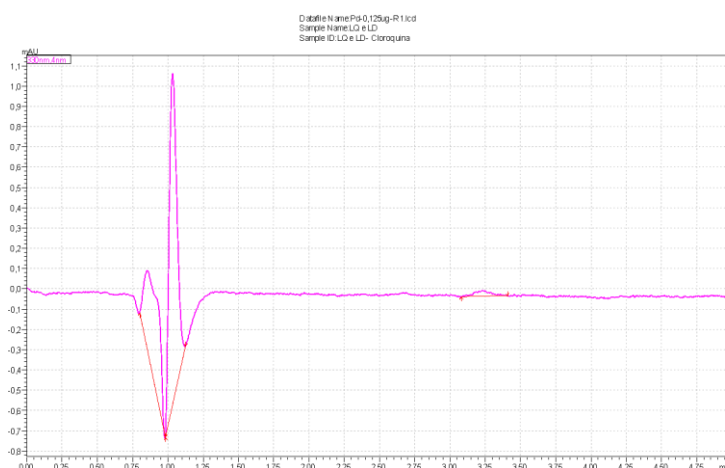


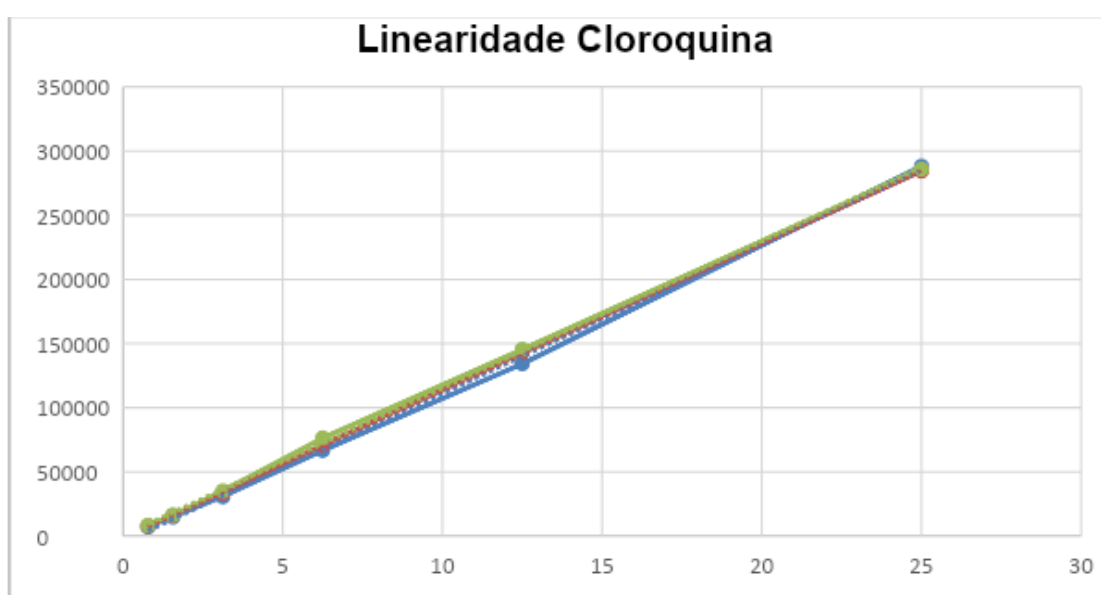
Figura 14. Cromatograma de solução aquosa de cloroquina a 125 ng/ mL = limite de identificação.



### 6.1.3. Linearidade (curva analítica)

As curvas analíticas foram feitas em 3 dias diferentes com sextuplicata para cada concentração, conforme o preconizado pela RDC 166/2017. A partir das três curvas analíticas obteve-se a equação para quantificação da CQ, onde:  $\text{Concentração} = (\text{ABS} + 11508,66) / 2186,42$ . As três curvas analíticas apresentam excelente linearidade, com um  $r = 0,9990 \pm 0,0005$  (figura 15).

Figura 15. Curvas analíticas obtidas para a cloroquina em três dias diferentes.



### 6.1.4. Robustez

A robustez do método foi verificada por mudanças mínimas em alguns parâmetros analíticos, descritos na tabela 2. Cada parâmetro foi alterado por vez (variação) e as áreas do sinal da CQ foram comparadas com as áreas do sinal obtidas com o método desenvolvido (nominal).

Os resultados da robustez, em termos de áreas do sinal da CQ se encontram na tabela 3. É possível notar que não há variação discrepante das médias em relação à condição nominal (desenvolvida e validada) com as suas variações. Os valores de coeficiente de variação (CV) mostram uma precisão aceitável, onde os valores se encontram abaixo de 5%.

Portanto, pode-se concluir que o método consegue suportar as pequenas variações que possam vir a ocorrer durante a corrida cromatográfica, sendo assim, o método é robusto.

Tabela 2: parâmetros avaliados para obtenção da robustez.

Parâmetros Analíticos	Nominal		Variação	
Molaridade do tampão (mM)	10	A	11	a
Concentração de acetonitrila na FM %	5	B	4	b
Fluxo FM (mL)	0,25	C	0,23	c
Absorbância (nm)	330	D	331	d
Temperatura do forno (°C)	50	E	48	e
Marca da acetonitrila	Merck	F	Fluka	f

FM = fase móvel

Tabela 3: resultados do teste de robustez para cloroquina

Parâmetros	0	1	2	3	4	5	6
Molaridade do tampão (mM)	A	a	A	A	A	A	A
Concentração de ACN na FM %	B	A	b	B	B	B	B
Fluxo FM (mL)	C	B	C	c	C	C	C
Absorbância (nm)	D	C	D	D	d	D	D
Temperatura forno (°C)	E	D	E	E	E	e	E
Marca ACN	F	F	F	F	F	F	f
<b>Concentração 150 µg/mL</b>							
Média	251235	275687	252921	258007	254823	254525	255390
DP	9403,2	3059,53	3953,4	589,8	206,9	269,4	721,9
CV%	3,64	2,97	2,48	4,52	3,27	3,23	2,36
<b>Concentração 4,69 µg/mL</b>							
Média	7100	8027	7412	7272	7310	7192	7117
DP	328,7	269,4	3059,5	269,58	1526,5	698,606	168,8
CV%	4,45	0,92	4,73	4,54	2,34	2,72	2,34

FM = fase móvel; ACN = acetonitrila; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.



### 6.1.5. Precisão e exatidão

- Precisão:

A precisão foi realizada pelo método da repetibilidade com análise em triplicata no mesmo dia (intra-dia) e em dias subsequentes (entre dias), nas concentrações de 150, 18,75 e 4,69 µg/ mL.

Como pode ser observado nas tabelas 4 e 5, não houve diferença entre as médias das áreas do sinal, com coeficiente de variação inferior a 5%, portanto o método é preciso para a análise da CQ.

Tabela 4: precisão inter-dia

Concentração µg/ mL	Precisão interdia			Média	Desvio-padrão (DP)	CV %
150	262350	278027	281081	273820	10049,35	3,67
18,75	33973	34353	34163	34163	190,1667	0,56
4,69	7162	7454	7308	7308	146	2,00

CV% = coeficiente de variação

Tabela 5: precisão intra-dia

Concentração µg/ mL	Precisão intra dia			Média	Desvio-padrão (DP)	CV %
150	258713	262728	265610	262350	3463,97	1,32
18,75	30328	30442	30879	30550	290,85	0,95
4,69	7268	7187	7031	7162	120,46	1,68

CV% = coeficiente de variação

- Exatidão:

A exatidão foi determinada através das 6 concentrações provenientes da curva analítica, feita em triplicata por 3 dias consecutivos. Obteve-se a média das áreas das concentrações testadas e com essa média a concentração experimental, usando a equação para cálculo de concentração  $(ABS + 11508,66) / 2186,42$ . A concentração experimental assim obtida foi comparada com a concentração nominal (teórica) (tabela 6). Os resultados demonstram as maiores variações de 89,65 a 107,35 % para 25,0 e 3,0 µg/ mL, respectivamente, portanto dentro das especificações da RDC 166/ 2017, que preconiza que a exatidão deve estar entre 85 - 115%.

Tabela 6: exatidão da cloroquina em 6 concentrações diferentes

Concentração Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs M	Conc	$\Delta\text{ug}$	$\Delta\mu\text{g} \%$	$\Delta \%$
25,0	288026	284416	285805	286083	22,414	-2,6	-10,35	89,65
12,5	134285	143264	145463	141004	11,485	-1,02	-8,12	91,88
6,25	66732	71123	76399	71418	6,243	-0,01	-0,11	99,89
3,0	30666	33401	35154	33074	3,355	0,23	7,35	107,35
1,56	14851	15973	16288	15704	1,500	-0,06	-3,85	96,15
0,78	7132	7796	7530	7486	0,700	-0,08	-10,26	89,74

Abs = absorvância; M = média; conc = concentração

### 6.1.6. Recuperação

A recuperação do método foi realizada em duas concentrações diferentes do padrão de CQ (50 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), conforme experimental. A taxa de recuperação ficou entre 96,40 e 101,24%, considerada dentro das normas da ANVISA (85 – 115%) (tabela 7).

Tabela 7: recuperação da cloroquina em duas concentrações diferentes

50 $\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Área 3	M	DP	CV%	Rec %
Solução aquosa	39968	38282	38866	39038,67	856,15 96	2,19	
Extrato de plasma	36116	36948	39841	37635	1955,2 19	5,20	<b>96,40</b>
200 $\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Área 3	M	DP	CV%	Rec %
Solução aquosa	161278	165296	163559	163377,7	2015,1 28	1,23	
Extrato de plasma	164390	159514	172296	165400	6450,5 78	3,90	<b>101,237 8</b>

M = média; DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; Rec = recuperação.

## 6.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TRANSFERÊNCIA CLOROQUINA DO PLASMA DAS MÃES PARA O PLASMA FETAL AO FINAL DA GRAVIDEZ (GD 21)

A tabela 8 apresenta as concentrações plasmática de CQ em ratas grávidas e respectivos fetos após tratamento materno com dose única desta 4-aminoquinolina antimalárica ao final da gravidez (GD 21).

Tabela 8: Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cloroquina (50 mg/kg peso corporal, po) determinadas no plasma das ratas grávidas e no plasma de seus fetos à termo (GD21)

RATAS (NINHADAS)	TEMPO APÓS TRATAMENTO (MIN)	Plasma MATERNO	Plasma FETAL				
			GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	Média ( $\pm$ DP)
1	120	9,3	6,4	6,1	6,3	6,3	6,3 ( $\pm$ 0,13)
2	120	6,8	5,8	5,6	-	5,7	5,7 ( $\pm$ 0,06)
3	120	7,2	5,5	-	-	5,5	5,5 ( $\pm$ 0)
4	60	6,5	5,9	5,9	5,7	5,8	5,8 ( $\pm$ 0,10)
5	60	5,9	-	-	-	-	-

Grupos 1 a 4: pools de diferentes fetos de uma mesma ninhada. (-) não foi possível quantificar.

Os dados que constam da Tabela 8 mostram que o método analítico permitiu quantificar a CQ no plasma de mães e respectivos fetos. Esses resultados preliminares sugerem que, ao final da gravidez, a cloroquina atravessa com facilidade a placenta, atingindo nos fetos concentrações plasmáticas correspondentes a  $\approx$ 89% da concentração plasmática materna. Duas horas (120 min) após o tratamento, a concentração plasmática materna é ligeiramente superior ao observado 60 min depois da administração oral do fármaco, e as concentrações no plasma fetal corresponderam a níveis  $\approx$  68%,  $\approx$ 83% e  $\approx$ 76% aos níveis encontrados na mãe.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Na tabela 9 encontram-se métodos de quantificação da CQ em algumas matrizes, como comprimidos, sangue (plasma ou soro) e urina.

É possível observar que o tempo de análise em sua maioria não ultrapassa os 20 min, exceto o método de Projean e colaboradores (2003). É visto que a maioria dos métodos é relativo ao emprego de CLAE, sendo que Kurawattima (2013) emprega CLUE, contudo é utilizado um equipamento associado à a técnica de Espectrometria de Massas (CLUE-EM). Armstrong (2017) também faz a utilização de CLUE para suas quantificações, porém a matriz utilizada em seu estudo é o soro, logo pode-se dizer que o método desenvolvido e validado para esta Dissertação é um método inédito para a quantificação da CQ na matriz biológica plasma.

Outro ponto a se destacar é a utilização, no método da Dissertação, de uma coluna de sílica modificada com grupos ciano. A fase móvel é composta por água ultrapura e acetonitrila (ACN) o que torna o método menos agressivo à coluna e menos custoso.

Tabela 9: Métodos de quantificação da Cloroquina (em diversas matrizes) por CLAE/CLUE na literatura

Autor	Matriz	Coluna	Fase móvel	Isocrático/Gradiente	Tempo de Retenção (min)	Tempo de análise (min)	Comprimento de onda (nm)
Zuluaga-Idárraga et al. (2014)	Plasma (humano)	C18	metanol/ tampão de ácido ortofosfórico (gradiente)	Gradiente	6.0	24	331
Cheomung e Bangchang (2011)	Sangue	C18	dietilamina/ACN / metanol (isocrático)	Isocrático	6.4	10	NI
Khalil et al. (2011)	Plasma (humano)	Zorbax SB-CN (com pré-coluna)	acetonitrila: tampão fosfato: perclorato de sódio	NI	NI	NI	237
Miranda et al. (2015)	Comprimido	C18	acetonitrila e Trietilamina aquosa	Gradiente	2.58	5	260
Miranda et al. (2015)	Comprimido	C18 (UPLC)	acetonitrila e Trietilamina aquosa	Gradiente	1.00	4	260
Moore et al. (2011)	Plasma	C6-phenyl (com pré-coluna)	Tampão fosfato e acetonitrila	Isocrático	5.2	7	343
Karunajeewa HA et al (2008)	Plasma	Chromolith Performance	Acetonitrila:Tampão fosfato	NI	6.7	NI	340
Cardoso et al (2019)	Comprimido	Chirobiotic V	metanol: ácido acético: trietilamina	Gradiente	10	15	258
Armstrong (2017)	Soro (humano)	Fenil (fase reversa)	Ácido oxálico: Água acidificada: Metanol	Gradiente	1.3	4	343
Charlier (2019)	Sangue	C18	Água: Metanol: Acetonitrila	Isocrático	16	20	370
Samanidou et al (2005)	Soro e Urina	C18	Metanol:Acetonitrila: Acetato de amônio (método reverso)	Isocrático	3.5	N.I	375 (fluorímetro)
Projean et al. (2003)	Incubações microscópicas de CQ	C1	Metanol: Água acidificada	Isocrático	11	30	380
Muga et al (2018) – adapta método de Miranda	Nanopartícula de CQ	C18	Acetonitrila -	Isocrático	NI	5	260

Kurawattimath (2012) – acoplado a massas	Plasma	C18	NI	NI	NI	NI	NI
Brown-Awala et Al (1989)	Plasma Saliva	Ciano	Acetonitrila:Metanol: Dietilamina	Isocratico	NI	NI	343
Okonkwo e Ekong (1988)	Sangue Urina	Altex 466mm x 5mm	Agua:Acetonitrila	Isocratico	8.5	10	344
Estadieu, Durand, Durand (1989)	Sangue (plasma)	C18	Dihidrogeniofosfato:Acetonitrila	Isocratico	5.35	20	343/242
Obua et al (2006)	Plasma	Ciano	Acetonitrila:Percolorato de Sodio	Isocrático	4.65	10	343
Sena et al (2019)	Plasma	C18	Diclorometano:Metanol	NI	NI	NI	380
Coelho et al (2017)	Comprimido	C18	Tampão Fosfato:Metanol	Isocrático	9.2	12	250

NI = não informado

## 7.2. FARMACOCINÉTICA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PASSAGEM TRANSPLACENTÁRIA

Como salientado na introdução e justificativa deste trabalho, o objetivo primário foi o desenvolvimento e validação de método analítico para uso posterior em estudos voltados para esclarecimento de questões ainda em aberto acerca da farmacocinética da cloroquina, medicamento que ainda tem papel importante como antimalárico e adjuvante em condições como artrite reumatoide, lúpus eritematoso, amebíase extra-hepática e alguns outros.

Para testar o desempenho do método, realizou-se uma experiência preliminar abordando uma dessas questões, ou seja, a passagem da cloroquina através da placenta.

Meio Século ou mais após ter sido introduzida como medicamento revolucionário para tratamento da malária, a CQ continua a desempenhar papel essencial no arsenal de medicamentos disponíveis para combater essa doença parasitária, sendo eficaz, segura para essa indicação terapêutica e, também, de baixo custo. O uso em larga escala e irracional deste fármaco, assim como ocorre com muitos outros, resultou no aparecimento de resistência, em decorrência da seleção de cepas *Plasmodium falciparum* resistentes a esta 4-aminoquinolina, particularmente no continente africano. Ela permanece útil como medicamento de primeira linha para a malária causada pelo *P. vivax*, a infecção predominante no Brasil. A interrupção

do uso indiscriminado da CQ, com a substituição dela por outros antimaláricos com modo de ação distinto, entretanto, diminui a pressão seletiva e pode resultar em progressivo desaparecimento das cepas de plasmódio resistentes a este fármaco.

Alguns poucos estudos ao longo dos anos confirmaram a passagem da cloroquinada mãe para o feto ao final da gravidez. Os resultados, ainda que preliminares, obtidos neste estudo em ratos são consistentes com a interpretação de que a cloroquina usada para tratar a mãe é eficientemente transferida para o compartimento embrionário-fetal atingindo, ao final da gravidez, níveis no plasma fetal que correspondem a valores entre 67% e 89% das concentrações determinadas no plasma materno.

Akintowae colaboradores (1988) investigaram em um grupo pequeno de mulheres a transferência placentária da cloroquina da mãe para o feto ao final da gravidez (gravidez à termo). Sete mulheres grávidas receberam antes do parto uma injeção intramuscular de fosfato de cloroquina (5mg/kg de peso corporal) enquanto outras 6 mulheres grávidas não tratadas constituíram o grupo controle. Por ocasião do parto, amostras de sangue venoso materno e sangue venoso e arterial do cordão umbilical (sangue fetal) foram coletadas. As concentrações de cloroquina no sangue materno variaram de 0,438 a 1,1193 µg/mL enquanto os níveis no sangue venoso fetal variaram de 0,607 a 0,869 µg/mL e no arterial de 0,480 to 0,905 µg/ml; resultados estes que indicam a eficiente transferência materno fetal da cloroquina ao final da gravidez.

Estes achados também são consistentes com os resultados de um estudo posterior relatados por Law e colaboradores (2008). Os autores constataram em um grupo de 19 mulheres melanésias (Papua Nova Guiné) grávidas tratadas profilaticamente com CQ (oral; 25 mg/kg de peso dividido por três dias), a mediana (e intervalo interquartil) das razões entre as concentrações plasmáticas no cordão umbilical (i.e., sangue fetal) e sangue materno foi 1.1 (0.9, 1.6) para cloroquina e 1.2 (0.5, 1.8) para o seu principal metabólito bioativo, a desetilcloroquina. Law e colaboradores (2008) também observaram em 169 filhos de mães tratadas profilaticamente com CQ, um caso de hipertireoidismo congênito e outro de defeitos cardíacos (tetralogia de Fallot). Embora não haja evidência de relação desses defeitos congênitos com o tratamento materno: anomalias detectadas ao nascimento foram registradas em 1,2% dos recém-natos expostos no útero à CQ, e em 4 neonatos (0,9%) do grupo controle não expostos. Ou seja, embora passe eficientemente através da placenta, a CQ não parece ter afetado adversamente o desenvolvimento do embrião humano.

Como vimos, a passagem transplacentária da CQ e metabólitos tem sido pouco explorada na literatura, mas outras questões relativas a alterações da farmacocinética desta 4-aminoquinolina na gravidez e durante o desenvolvimento pós-natal foram relatadas.

Por exemplo, Chukwuanie colabores (2004), comparando, em mulheres nigerianas, a taxa de conversão da cloroquina (CQ) em seu metabólito desetilcloroquina (DECQ), em voluntárias no primeiro trimestre de gravidez e voluntárias não grávidas, verificaram que a gravidez induziu a depuração (*clearance*) metabólica desta 4-aminoquinolina. Segundo os autores, o  $C_{max}$  e a  $AUC_{0-48 h}$  da desetilcloroquina foram claramente mais elevados nas grávidas do que no grupo (controle) de não grávidas variando a razão  $AUC(CQ) / AUC(DECQ)$  de 0,09 a 0,35 entre as grávidas e de 1,70 a 4,81 entre as não grávidas.

Outro estudo realizado por Sena *et al.* (2019) examinou os regimes de tratamentos usados para crianças entre 02 e 14 anos para tratar a malária causada por *P. vivax* em várias regiões endêmicas da Amazônia brasileira. Esse estudo constatou o generalizado emprego de dosagens sub ótimas em crianças e adolescentes, chamando a atenção para a necessidade de estudos farmacocinéticos visando à otimização de recomendações posológicas para essa faixa etária.

Os parâmetros farmacocinéticos da cloroquina foram estudados por Karunajeewa *et al.* (2008) em um grupo de crianças melanésias de 5 a 10 anos da Papua Nova-Guiné com malária não complicada. As medianas (intervalo interquartil) foram volume de distribuição no estado estacionário (*steadystate*) relativo à biodisponibilidade ( $V_{ss}/F$ ); 154 l/kg (100 a 210 l/kg); depuração ( $Cl/F$ ): 0.8 l/h/kg (0,52 a 0,96 l/h/kg); meia-vida ( $t_{1/2}$ ) 233 h (206 a 298 h). A meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para a desetilcloroquina (modelo não compartimental) foi 290 h (236 a 368 h).

Em relação aos estudos da farmacocinética da cloroquina em animais de laboratório, merece destaque a investigação de Moore e colaboradores (2011) sobre a disposição e farmacodinâmica desta 4-aminoquinolina em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei*. Os resultados mostraram que neste modelo murino a meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ), *clearance* ( $Cl$ ) e volume distribuição ( $V_d$ ) foram 46,6 h, 9,9 l/h/kg de peso e 667 l/kg de peso, e 93,3 h, 7,9 l/h/kg de peso, e 1222 l/kg de peso, para camundongos sadios e infectados, respectivamente. Esses resultados demonstram que a malária torna a eliminação da cloroquina mais lenta, reduz o *clearance* (reflexo da regulação negativa da expressão de enzimas de biotransformação de xenobióticos) e, também, aumenta o volume aparente de distribuição. A detalhada relação de escala (alometria) para parâmetros farmacocinéticos da cloroquina entre espécies, incluindo o homem, também é apresentada pelos autores, o que é útil para desenho



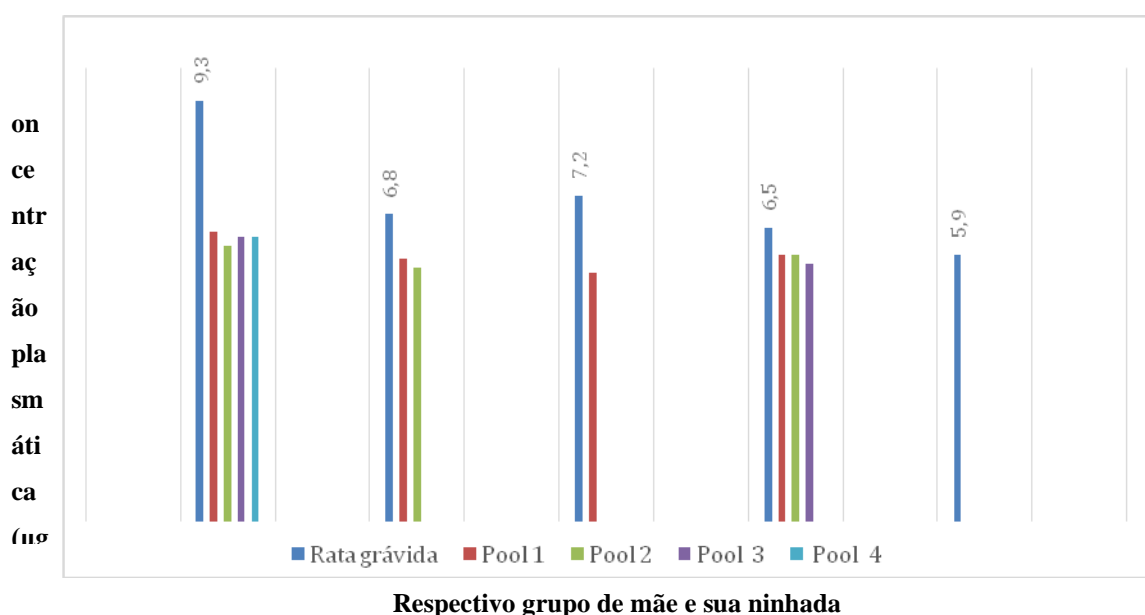
de estudos experimentais e relevante para extrapolações entre espécies em ensaios da cloroquina e, também, quanto este fármaco antimalárico é usado como medicamento comparador.

Como demonstrado pelos dados apresentados na Tabela 8, o emprego do método desenvolvido e validado neste estudo para quantificação da cloroquina em plasma evidenciaram que, ao final da gravidez de ratos, a cloroquina atravessa com facilidade a placenta alcançando, nos fetos à termo, 60 minutos após a administração oral do fármaco, concentrações plasmáticas equivalentes à cerca de 89% os níveis maternos. Duas horas após o tratamento das mães com cloroquina, os níveis no plasma fetal permaneceram altos correspondendo a 70% ou mais das concentrações plasmáticas registradas no plasma materno (figura 16).

Esses resultados preliminares são consistentes com os que foram relatados na escassa literatura disponível sobre a passagem transplacentária da cloroquina em humanos. Estudos mais completos serão futuramente realizados com o emprego deste método para investigar a transferência da cloroquina da mãe para o conceito em roedores (ratos e camundongos) saudáveis e infectados com *P.berghei* e/ou *P.chabaudi*.

É plausível supor que esse método poderá – com mínimos ajustes - ser futuramente utilizado para realizar estudos, mais abrangentes do que os publicados na literatura, para confirmar a passagem transplacentária da cloroquina em gestantes saudáveis e com malária.

Figura 16: Relação entre a concentração de CQ de no plasma materno e no plasma dos fetos da respectiva ninhada (cada grupo ou pool contém o sangue 2 a 4 de uma mesma ninhada).



## 8. CONCLUSÃO

A cloroquina é um fármaco antimalárico desenvolvido há mais de 50 anos, que foi reposicionado para uso como imunomodulador no tratamento de algumas doenças inflamatórias de etiologia autoimune como o Lúpus Eritematoso Sistêmico e a artrite reumatóide. Em ambos os casos, tanto na malária, como nas doenças crônicas para a qual é indicada na bula aprovada pela ANVISA, a cloroquina pode eventualmente vir a ser utilizada em mulheres grávidas. Dispor de método analítico, sensível, confiável, robusto de custo relativamente baixo contribui para estudos pré-clínicos e clínicos da farmacocinética da cloroquina, entre os quais os da cinética na gravidez e passagem transplacentário são particularmente importantes para preencher lacunas na base de dados disponível sobre a eficácia e segurança deste fármaco antimalárico.

Nesse estudo, foi possível estabelecer um método simples e inovador para quantificar a cloroquina no plasma usando CLUE-DAD-UV. Acreditamos que adaptações possam ser feitas no método para que o mesmo possa ser usado para quantificação do fármaco em outras matrizes biológicas, como soro, líquido amniótico e placenta, propostas iniciais do trabalho que não puderam ser desenvolvidas. O método serviu para verificar, preliminarmente, a eficiente passagem placentária da cloroquina em ratos confirmando os escassos dados publicados a esse respeito fornecidos por investigações clínicas.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; LUTY, J. Testing for illicit drug use in mental health services. **Advances in psychiatric treatment**, London, v. 16, p. 369-379, 2010.
- ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada 166, **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. 2017.
- ARANCÍBIA, A. Biodisponibilidade de medicamentos. Consideraciones generales. Aspectos farmacocinéticos; **Simposio Internacional I**, Santiago: Universidad de Chile, p. 25-51, 1992.
- ARMSTRONG N., RICHEZ M., RAOULT D., CHABRIERE E.,  
Simultaneous UHPLC-UV analysis of hydroxychloroquine, minocycline and doxycycline from serum samples for the therapeutic drug monitoring of Q fever and Whipple's disease. **Journal of Chromatography B**, v.1060, p. 166-172, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.011>, acesso em fevereiro de 2020.
- BARROS A.L.A.; SOARES A. D. N; PESSOA, M. C. P.; TEIXEIRA, R. A. *et al.*;  
Deficiência de vitamina A em crianças residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais; **Revista Mineira de Enfermagem**. v.14 (3), p.386-393, 2010.
- BELIZNA, C.; Hydroxychloroquine as an anti-thrombotic in antiphospholipid syndrome. **Autoimmunity reviews**, v. 14 (4), p. 358-362, 2015.
- BORDIN, D.; MONEDEIRO, F. F. S.; CAMPOS, E. G.; RABELO A. M. N *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Science Chromatography**. v. 7 (2), p.125-43, 2015.
- BROWN-AWALA *et al.* Chloroquine levels in plasma and saliva. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 29, p.1135-1139, 1989.
- CABRAL, R. T.S.; KLUMB, E. M.; COUTO, M. I. N. N.; CARNEIRO, S. *et al.* Evaluation of toxic retinopathy caused by antimalarial medications with spectral domain optical coherence tomography. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 82 (1), p. 12-17, 2019.
- CAO B., SHETH N.M., MYSOREKAR U.I. To Zika and destroy: an antimalarial drug protects fetuses from Zika infection; **Future Microbiology**. v.13(2), p. 137-143, 2018.
- CARDOSO, P. A.; PEREIRA, D. B., EL-BEHAIRY, M. F.; GHANEM, A. *et al.*; Chirobiotic V Versus Chiralpak ID for the Enantioselective Chromatographic Separation of Chloroquine. **Journal of Chromatographic Science**. p.1-8, 2019.
- CARMO, A. P. B.; BORBOREMA, M.; RIBEIRO, S.; DE-OLIVEIRA, A. C. X. *et al.* .A new validated high-performance liquid chromatography method with diode-array ultraviolet detection for analysis of the antimalarial drug primaquine in the blood plasma. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 50, p. 499-505, 2017.

CARNEIRO, N. K.; MAEDA O.; CARNEIRO, J. L.; FUJITA, T. C *et al.*; Dosagem plasmática de peroxidação lipídica nos diferentes estadiamentos do câncer de mama. **Anais do XIX EAIC**. 2010

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; ROCHA M., L. R.; OLIVEIRA, R. V. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32 (4), p. 1021-1030, 2009.

CASTRO, A. L.; TARELHO, S.; SILVESTRE, A.; TEIXEIRA, H. M. Simultaneous analysis of some club drugs in whole blood using solid phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, Oxford, v. 19, p. 77-82, 2012.

CHARLIER B. *et al.*; Development and Validation of a Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (RP-HPLC-FL) Method to Quantify Ruxolitinib in Plasma Samples. *Analytical Letters*, vol 52 (8), p.1328-1339, 2019. Doi: [10.1080/00032719.2018.1537283](https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1537283), acesso em fevereiro de 2020.

CHEOMUNG A, Na-BANGCHANG Na K; HPLC with ultraviolet detection for the determination of chloroquine and desethylchloroquine in whole blood and finger-prick capillary blood dried on filter paper, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 55, p.1031-1040, 2011.

CHINCHOLE, R.; HATRE, P. M.; DESAI, U.; CHAVAN, R. Recent applications of hyphenated liquid chromatography techniques in forensic toxicology: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v. 14 (1), 2012.

CHOPRA, A.; SALUJA, M.; VENUGOPALAN, A.; Effectiveness of Chloroquine and Inflammatory Cytokine Response in Patients With Early Persistent Musculoskeletal Pain and Arthritis Following Chikungunya Virus Infection: Effectiveness of Chloroquine for Post-Chik Musculoskeletal Disorders. **Arthritis & Rheumatology**. vol. 66 (2), p. 319–326, 2014.

CHUKWUANI, M. C.; BOLAJI, O.; ONYEJI, C. O.; MAKINDE, O. N *et al.*; Evidence for increased metabolism of chloroquine during the early third trimester of human pregnancy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9 (5), p. 601-605, 2004.

COELHO, A.S.; CHAGAS, C. E. P.; MAIA DE PÁDUA, R.; PIANETTI, G. A. *et al.*; A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.145, p.248-254, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.023>, acesso em março de 2020.

COLSON, P.; ROLAIN, J.-M.; LAGIER, J.-C.; RAOULT, D. *et al.*; Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19; **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2020. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105932>, acesso em março de 2020

COOPER, R. G.; MAGWERE, T.; Mini review-Chloroquine has not disappeared. **African Health Sciences**. v. 7 (3), 2007.

COSTANTINE M.M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **Front Pharmacology**. 2014.

DIFOSFATO DE CLOROQUINA. Responsável Técnico: Carlos Araújo da Costa. Local: Farmanaguinhos (Fiocruz)-Rio de Janeiro, 2017. **Bula de remédio**.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**. São Paulo. v. 7, p. 21-25, 1998.

DESAI, M. Prevention of malaria in pregnancy. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 18 (4), p. 119–132, 2018.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R.S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. *et al.* Microextração em fase líquida (LPME). **Química Nova**. v. 31 (3), p. 637-644, 2008

DRUG BANK. **Chloroquine 2005**, from DRUG BANK:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00608>

DURAND E.; DURAND A.; VIALA. A.; Rapid HPLC Procedure for the Simultaneous Determination of Chloroquine, Monodesethylchloroquine, Diazepam, and Nordiazepam in Blood. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 13, 1989.

ETTRE, L. S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. *Chromatographia*. **Wiesbaden**, v. 51 (1/2), 2000.

FEGHALI M., VENLATARAMANAN R.; CARITIS S.; Pharmacokinetics of drugs in pregnancy. **Seminary Perinatology**. v. 39 (7), p.512-519, 2015.

FOOD and Drug Administration (FDA). *Medicine & Pregnancy*.

GACHELIN, G.; GARNER, P.; FERRONI, E.; TROHLER, U. *et al.* Evaluating Cinchona bark and quinine for treating and preventing malaria. **Journal of the Royal Society of Medicine**; v. 110 (1), p. 31-40, 2017.

GIBALDI, M.; **Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics**. 4.<sup>a</sup> ed., Pennsylvania: Lea &Febiger, 1991.

GOSS, A.; Building the world's supply of quinine: Dutch colonialism and the origins of a global pharmaceutical industry. **Endeavour**, v. 38 (1), p. 8-18, 2014.

INSTITUTO Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JENSEN, M.; MEHLHORN, H.; Seventy-five years of Resochin® in the fight against malaria. **Parasitology research**. v. 105 (3), p. 609-627, 2009.

KARUNAJEEWA, H. A.; ILETT, K. F.; MUELLER, I.; SIBA, P. *et al.* Pharmacokinetics and efficacy of piperazine and chloroquine in Melanesian children with uncomplicated malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 52 (1), 237-243, 2008

- KATEERA, F.; NSOBYA, S. L.; TUKWASIBWE, S.; HAKIZIMANA, E. *et al.*; Molecular surveillance of Plasmodium falciparum drug resistance markers reveals partial recovery of chloroquine susceptibility but sustained sulfadoxine-pyrimethamine resistance at two sites of different malaria transmission intensities in Rwanda. **Actatropica**. v. 164, p. 329-336, 2016.
- KATZUNG, B.G.; TREVOR, A. J. Pharmacology: Examination and board review. **Appleton & Lange**, 1993.
- KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. (Ed.). HPLC for pharmaceutical scientists. **New York: Wiley-Interscience**, 2007.
- KHALIL, I.; ALIFRANGIS, M.; RECKE, C.; HOEGBERG, L. *Cetal.*; Development of ELISA-based methods to measure the anti-malarial drug chloroquine in plasma and in pharmaceutical formulations. **Malaria Journal**. v.10, p.249, 2011.
- KURAWATTIMATH V.; POCHA, K.; MARIAPPAN, T. T.; TRIVEDI, R. K *et al.* A modified serial blood sampling technique and utility of dried-blood spot technique in estimation of blood concentration: application in mouse pharmacokinetics. **European Journal Drug Metabolism Pharmacokinetics**. v. 37, p.23–30, 2012.
- LACAVA, A.; Complicações oculares da terapêutica com a cloroquina e derivados. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 73 (4), p. 384-389, 2010.
- LARA, P.F. Modelos Farmacocinéticos. **Farmacologia integrada. 2ª ed.**, Rio de Janeiro: Revinter, cap. 10, p. 81-90, 2004.
- LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. *et al.*; Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos; **Revista Brasileira de Farmácia**.; v. 88 (4), p. 177-180, 2007.
- LLANOS C.; IZMIRLY P.M.; KATHOLI M.; CLANCY, R. M *et al.*; Recurrence rates of cardiac manifestations associated with neonatal lupus and maternal/fetal risk factors. **Arthritis Rheumatology**. vl. 60, p.3091-3097, 2009.
- LAW, I. ILETT, K. F.; HACKETT, L. P.; PAGE-SHARP, M. *et al.*; Transfer of chloroquine and desethylchloroquine across the placenta and into milk in Melanesian mothers. **British journal of clinical pharmacology**. v. 65 (5), p. 674-679, 2008.
- LIMPER M.; SCIRE C.A.; TALARICO R.; AMOURA, Z. *et al.*; Antiphospholipid syndrome: state of the art on clinical practice guidelines. **RMD**. v.4, 2018.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 5 (3), p. 55–64, 2014.
- MALDANER L, JARDIM I.C.S.F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**. v.32 (1), p. 214-222, 2009.
- MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência; **Química Nova**. Vol. 32 (1), p. 214-222, 2012.

MIRANDA, T. A.; SILVA, P. H.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C. *et al.* Simultaneous quantitation of chloroquine and primaquine by UPLC-DAD and comparison with a HPLC-DAD method. **Malaria Journal**, v.14, p.29, 2015.

MOORE, B. R.; PAGE-SHARP, M., STONEY, J. R.; ILET, K. F. *et al.*; Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and allometric scaling of chloroquine in a murine malaria model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 55 (8), p. 3899-3907, 2011.

MUGA *et al.*; In vitro evaluation of chloroquine-loaded and heparin surface-functionalized solid lipid nanoparticle. **Malaria Journal**. v. 17, p.133, 2018.

OBUA, C.; NTALE, M.; LUNDBLAD, M. S.; MAHINDI, *Met al.*; Pharmacokinetic interactions between chloroquine, sulfadoxine and pyrimethamine and their bioequivalence in a generic fixed-dose combination in healthy volunteers in Uganda. **African Health Sciences**. v. 6 (2), 2006.

OKONKWO E.; Simultaneous determination of chloroquine and metronidazole in human biological fluid by high pressure liquid chromatography. **Life Sciences**. v. 42, pp. 539-545, 1988.

OLAFUYI, O.; BADHAN, R. K. S.; Dose Optimization of Chloroquine by Pharmacokinetic Modeling During Pregnancy for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**; v. 108 (1), p. 661–673, 2019.

OSTERESCH B.; VIEGAS, S.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U.; Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots. **Anal Bioanalysis Chemistry**. v. 409, p.3369–3382. 2017.

PAOLETTI P. G. F.; ERRECALDEERLICHER, C.; URZÚA PIZARRO, N. F.; TONINI GARCÍA, M. P. *et al.*; Farmacocinética plasmática e urinária de marbofloxacin intramuscular em caninos. **Revista. Medicina Veterinaria**: Bogotá (Colombia). v.33, p.59-66, 2017.

PATIL, A. S.; SHENG, J.; DOTTERS-KATZ, S. K.; SCHMOLL, M. S. *et al.*; Fundamentals of Clinical Pharmacology With Application for Pregnant Women. **Journal of Midwifery & Women's Health**. v. 62 (3), p. 298–307, 2017.

PAUMGARTTEN F.J.R.; DELGADO I.F.; PITTA L.D.R.; OLIVEIRA, A. C. A. X. D.; Chloroquine and hydroxychloroquine repositioning in times of COVID-19 pandemics, all that glitters is not gold. **Caderno de Saúde Pública**.v. 36 (5), e00088520, 2020.

PERES, T. B.; Noções básicas de cromatografia.; Biológico, **São Paulo**. vol. 64 (2), p.227-229, 2002.

PIMENTA E. M.; SILVA, F. F. D.; BARBOSA, É. S.; CACIQUE, A. P. *et al.* Quantification of Glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD. **Journal Brazilian Chemical Society**. vol. 31 (2), p.298-304, 2020.

PROJEAN D.; BAUNE, B.; FARINOTTI, R.; FLINOIS, J. P. *et al.*; In vitro metabolism of chloroquine: Identification of CYP2C8, CYP3A4 and CYP2D6 as the main isoforms

catalyzing N-desethylchloroquine formation. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 31 (6), 2003.

PUBCHEM, 2019. Chloroquine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2719>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

RANG, Rang *et al.* Rang & dale farmacologia. Elsevier Brasil, 2015.

REMYNTOON, Joseph Price. Remington: The science and practice of pharmacy. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2006.

RIBANI M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F *et al.*, Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 (5), p.771-780, 2004.

SÁ, I. M.; A resistência à cloroquina e a busca de antimaláricas entre as décadas de 1960 e 1980. **História, ciências, saúde-Manguinhos**. v. 18 (2), p. 407-430, 2011.

SAKIYAMA, M.M.; Validação e verificação de metodologia analítica: Revisão Sistemática; Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo. 2018.

SALMAN, S.; BAIWO M.; PAGE-SHARP K.; KOSEB H. A. *et al.*; Optimal antimalarial dose regimens for chloroquine in pregnancy based on population pharmacokinetic modelling. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 50 (4), p. 542–551, 2017.

SAMANIDOU V.F.; EVAGGELOPOULOU E.V.; PAPADOYANNI N I.; Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. vol. 38, p. 21–22, 2005.

SCHERBEL A.L.; SCHUCTER S.L.; Comparison of the effects of two antimalarial agents, hydroxichloroquine and chloroquine in patients with rheumatoid arthritis. **Cleve Clinical Journal Medicinal**. v.24, p.98-104, 1957.

SCHREIBER K.; BREEN, K.; COHEN, H.; JACOBSEN, S. *et al.*; Hydroxychloroquine to improve pregnancy outcome in women with Antiphospholipid antibodies (HYPATIA) protocol: a multinational randomized controlled trial of hydroxychloroquine versus Placebo in addition to standard treatment in pregnant women with antiphospholipid syndrome or antibodies. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 43, p.562-71, 2017.

SENA, L. W. P.; MELLO, A. G. N. C.; DIAS F M. V.; DE ATAIDE, M. A. *et al.*; Doses of chloroquine in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in patients between 2 and 14 years of age from the Brazilian Amazon basin. **Malaria journal**. v. 18 (1), p. 1-7, 2019.

SIDDIQUI, N. S.; NASREEN, F.; PERVEEN F. A. *et al.*; Simultaneous determination of anti-diabetic drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.55, p. 17394, 2019

STORPIRTIS S.; CAMPOS R.; GONÇALVES J.E.; GAI N.M; Farmacocinética básica e aplicada; **Rio de Janeiro: Guanabara**; Koogan, 2011.



SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S.; **Pharmacy Technology**. v. 2, p.12, 1998.

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

TANENBAUM L, TUFFANELLI LD. Antimalarials agents. **Archive Dermatology**. ed.116, pag.587-59, 1980.

TARTAGLIA, A.; FPSE-HPLC-PDA analysis of seven paraben residues in human whole blood, plasma, and urine. **Journal of Chromatography B**. v.1125, 2019.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; **Pure Applies Chemistry**. V. 74, 2002

USHIDA, M.; TROLEZI, A. G. C.; **Estudo Retrospectivo de 76 Fetos de Mães com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**. v. 44 (5), p. 6, 2004.

WAGNER, J.G.; Fundamentals of Clinicaí Pharmacokinetics; **Drug Intelligence Publications**. p.57-120, 1975.

WHITE, N. J. *et al.*; Malaria. **The Lancet**. v. 383 (9918), p. 723–735, 2014

WHO, World Health Organization. Malaria in pregnancy. **Geneva**. 2015.

WHO, World Health Organization. Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010. **Geneva**.2010.

WOLFRAM J.; NIZZERO, S.; LIU, H.; LI, F.; ZHANG, G *et al.* A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodeliver. **Nature**. vl. 7, 2017.

WU K.; ZHANG, Q.; WU, X.; LU, W. *et Al.*; Chloroquine is a potent pulmonary vasodilator that attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension. **British Journal of Pharmacology**. v. 174 (22), p.4155-4172, 2017.

YARIPOUR, S.; EBRAHIMI, A. M.; Quantitative analysis of phenobarbital in biological fluids. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.56, p.17839, 2020.

ZULUAGA-IDÁRRAGA L.; JIMÉNEZA N. Y; Córdoba C. L.; BLAIR-TRUJILLOA S. *et al*; Validation of a method for the simultaneous quantification of chloroquine, desethylchloroquine and primaquine in plasmaby HPLC-DAD; **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 95, p. 200–220, 2014.