

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza**

**Desenvolvimento e validação de método analítico por eletroforese capilar de zona com  
detecção ultravioleta (CZE-UV), para a determinação simultânea de artesunato e  
mefloquina, em formulações farmacêuticas de dose fixa combinada**

Juiz de Fora

2019

**Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza**

**Desenvolvimento e validação de método analítico por eletroforese capilar de zona com detecção ultravioleta (CZE-UV), para a determinação simultânea de artesunato e mefloquina, em formulações farmacêuticas de dose fixa combinada**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Flávia e Carlos Henrique, por serem exemplos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e iluminar sempre o meu caminho.

Aos meus pais, Flávia e Carlos Henrique, pelo amor incondicional, por todo apoio, por acreditarem em mim e por me incentivarem a seguir e realizar meus sonhos. Por comemorarem cada conquista minha e me ajudarem a superar todas as dificuldades pelo caminho. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim. À minha irmã, Gabrielle, pelo amor, apoio, parceria e amizade, pelos nossos momentos de diversão e aprendizado uma com a outra. Vocês são minha base e foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Essa conquista é nossa! E rumo ao doutorado! Eu amo muito vocês!

Ao meu namorado Eduardo, pelo amor, atenção e apoio durante todos os momentos de conquistas e de dificuldades. Por me aguentar falar de eletroforese capilar e me incentivar a continuar realizando meus objetivos. A soma de você comigo é mais, te amo!

Aos meus avós, Antônio Carlos, Mariluce, Fábio e Vanda, pelo amor, carinho, por vibrarem à cada conquista minha e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Por todo apoio e incentivo. Amo vocês!

Ao meu orientador Marcone, já são cinco anos de muito aprendizado, desde à graduação ao mestrado. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, por acreditar em mim, pela paciência, conselhos e amizade!

Aos membros do Grupo de Química Analítica e Quimiometria, pela amizade ao longo de toda minha vida acadêmica. Em especial, agradeço as amigas Brenda e Renatinha pela paciência, aprendizado e por terem me acolhido desde a graduação. As amigas Maria Patrícia e Olívia, pela amizade, parceria, pela nossa troca diária de conhecimentos e de incentivos no laboratório (muitas vezes com direito a coxinhas, cigarretes e coca-cola!). E a todos os outros que passaram ou ainda estão pelo GQAQ, Fernando, Paula, Lucas, Tatiane, Leandra, Guilherme e Larissa, obrigada pelos conselhos.

A todas as minhas amigas, desde o colégio até a faculdade, vocês têm um lugar especial na minha vida.

Aos professores Dr. Renato Camargo Matos, Dra Paula Rocha Chellini e Dr. Gerson Antônio Pianetti pelas contribuições no exame de qualificação e na defesa da dissertação.

Ao Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza e ao Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) pela doação dos medicamentos e de matérias-primas dos fármacos.

Ao laboratório CEDAFAR da UFMG pela doação de matérias-primas dos fármacos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela infraestrutura.

À UFJF e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas e, juntamente com o CNPq e a FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa.

Palavras são, na minha nada humilde opinião,  
nossa inesgotável fonte de magia.

(J. K. Rowling)

A vida não é sobre metas, conquistas e linhas de chegada. É  
sobre quem você se torna durante a caminhada.

(Gisele Ferreira)

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasita do gênero *Plasmodium*, endêmica nos países com populações mais pobres, representando grave problema de saúde pública no mundo. Atualmente, o tratamento indicado é a terapia combinada da artemisinina, em que a artemisinina ou seus derivados são associados a outros fármacos antimaláricos. No Brasil, a associação artesunato-mefloquina é a terapia de primeira escolha para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* e, portanto, é importante o doseamento desses medicamentos para garantir que possuam qualidade, segurança e eficácia adequadas. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação simultânea de artesunato e mefloquina em formulações farmacêuticas de dose fixa combinada por eletroforese capilar de zona com detecção ultravioleta. Devido à baixa absorvidade molar do artesunato, foi necessário adicionar uma espécie cromófora no eletrólito. Dessa forma, o método consiste na detecção direta para a mefloquina e detecção indireta para o artesunato, ambos em 214 nm. As condições eletroforéticas foram: capilar de sílica fundida revestido com poliamida com comprimento de 48,5 cm e 50 µm de diâmetro interno, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10s, temperatura do cartucho mantida em 22,5 °C, voltagem positiva de 30 kV, detecção em 214 nm e eletrólito constituído por 30/15 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Tris/Ácido 3,5-dinitrobenzóico. Após o desenvolvimento do método, a validação do mesmo foi feita pela avaliação dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação. Todos os resultados obtidos foram satisfatórios.

Palavras-chave: Artesunato. Mefloquina. Eletroforese Capilar. Comprimidos de dose fixa combinada

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by a *Plasmodium* parasite, which is endemic in underdeveloped countries representing a serious public health problem in the world. Currently, the indicated treatment is the artemisin based combined therapy, in which the artemisin or its derivatives are associated with others antimalarial drugs. In Brazil, the artesunate-mefloquine combination is the first-choice therapy for the treatment of *P. falciparum* malaria and, therefore, it is important to dose these drugs to ensure that the medicine have appropriate quality, safety and efficacy. In this work, an analytical method was developed and validated for the simultaneous determination of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection. Due to the low molar absorptivity of artesunate, a chromophore species had to be added to the electrolyte. Thus, the method consists of direct detection for mefloquine and indirect detection for artesunate, both at 214 nm. The optimized electrophoretic conditions were: polyamide coated fused silica capillary with 48.5 cm long and 50  $\mu\text{m}$  internal diameter, hydrodynamic injection 30 mbar for 10 s, cartridge temperature maintained at 22.5 ° C, positive voltage of 30 kV, detection at 214 nm and electrolyte consisting of 30/15 mmol L<sup>-1</sup> of Tris/3,5-dinitrobenzoic acid buffer. After the method development, a validation was performed by evaluating the parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limits and quantification. All the results obtained were satisfactory.

Key words: Artesunate. Mefloquine. Capillary Electrophoresis. Fixed-dose combination tablets



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Mapa de risco da malária por município de infecção, em 2018.....	20
Figura 2:	Fórmulas estruturais de alguns fármacos antimaláricos.....	26
Figura 3:	Fórmula estrutural do artesunato e o valor de pKa.....	27
Figura 4:	Fórmula estrutural da mefloquina e os valores de pKa.....	28
Figura 5:	Representação esquemática de um sistema de CE.....	31
Figura 6:	Representação esquemática da migração de cátions (+), compostos neutros (N) e ânions (-), de diferentes tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.....	34
Figura 7:	Espectro de absorção do cloridrato de mefloquina, na concentração de 10 mg L <sup>-1</sup> , obtido durante a análise por eletroforese capilar.....	49
Figura 8:	Espectro de absorção do artesunato na concentração de 10 mg L <sup>-1</sup> .....	50
Figura 9:	Eletroferogramas do eletrólito, metanol e mefloquina na concentração de 10 mg L <sup>-1</sup> , em eletrólito constituído de 20 mmol L <sup>-1</sup> de tampão acetato, em 220 nm.....	52
Figura 10:	Curvas de distribuição para o artesunato.....	53
Figura 11:	Curvas de distribuição para a mefloquina.....	54
Figura 12:	Curvas de mobilidade efetiva para a mefloquina e o artesunato.....	54
Figura 13:	Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L <sup>-1</sup> , em eletrólito constituído por 20 mmol L <sup>-1</sup> tampão fosfato, em 192 nm (A) e 220 nm (B).....	56
Figura 14:	Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L <sup>-1</sup> , em eletrólito constituído por 20 mmol L <sup>-1</sup> tampão Tris/HCl, em 192 nm (C) e 220 nm (D).....	57
Figura 15:	Curvas de mobilidade efetiva para o artesunato, o BENZ e o 3,5-DNB.....	58
Figura 16:	Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L <sup>-1</sup> , em eletrólitos constituídos por 30 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato e 10 mmol L <sup>-1</sup> de BENZ (E) e por 30 mmol L <sup>-1</sup> de tampão acetato com 5 mmol L <sup>-1</sup> de 3,5-DNB (F), ambos em 220 nm.....	59
Figura 17:	Curva de mobilidade efetiva para o artesunato, a mefloquina, o 3,5-DNB e o Tris.....	60
Figura 18:	Ordem de migração dos analitos.....	61

Figura 19	Eletoferogramas da mistura de fármacos, na concentração de 200 mg L <sup>-1</sup> , em eletrólito constituído por 20/10 mmol L <sup>-1</sup> de tampão TRIS/3,5-DNB, em 214 nm (G), 220 nm (H) e 254 nm (I).....	62
Figura 20:	Eletoferogramas do eletrólito, do metanol e da amostra de 2-DFC, nas concentrações teóricas de 212 mg L <sup>-1</sup> para o artesunato e de 424 mg L <sup>-1</sup> para a mefloquina, em eletrólito constituído por 20/10 mmol L <sup>-1</sup> de tampão TRIS/3,5-DNB, em 214 nm.....	63
Figura 21:	Eletoferogramas dos ensaios de 1 a 6, conforme Tabela 10.....	65
Figura 22:	Eletoferogramas dos ensaios de 7 a 12, conforme Tabela 10.....	66
Figura 23:	Eletoferogramas dos ensaios de 13 a 15, conforme Tabela 10.....	67
Figura 24:	Estudo de repetibilidade dos ensaios 7 e 8.....	68
Figura 25:	Avaliação da seletividade do método desenvolvido e otimizado.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Esquema de tratamento para a infecção por <i>P. falciparum</i> com comprimidos de dose fixa combinada de artesunato e cloridrato de mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina (15 mg) em um dia.....	22
Tabela 2:	Esquema de tratamento para a infecção por <i>P. falciparum</i> com comprimidos de dose fixa combinada de artemeter e lumefantrina (20 mg + 120 mg) em três dias e primaquina (15 mg) em um dia.	23
Tabela 3:	Esquema de tratamento para as infecções por <i>P. vivax</i> com cloroquina (150 mg) em três dias e primaquina (5 mg infantil e 15 mg adulto) em sete dias (esquema curto)	23
Tabela 4:	Esquema de tratamento para a infecção mista por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> com comprimidos de dose fixa combinada de artemeter e lumefantrina (20 mg + 120 mg) ou artesunato e mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina (5 mg infantil e 15 mg adulto) em sete dias.	24
Tabela 5:	Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico.....	25
Tabela 6:	Matriz de planejamento Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	36
Tabela 7:	Valores para o cálculo da $\mu$ ART.....	51
Tabela 8:	Valores para o cálculo da $\mu$ MEF.....	51
Tabela 9:	Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para o estudo de otimização das condições eletroforéticas.....	64
Tabela 10:	Matriz de planejamento Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para o estudo de otimização das condições eletroforéticas.....	64
Tabela 11:	Voltagem, temperatura e concentração do tampão dos ensaios 7 e 8.....	67
Tabela 12:	Estudo de repetibilidade dos ensaios 7 e 8.....	68
Tabela 13:	Níveis de concentração para o artesunato e a mefloquina.....	70
Tabela 14:	Valores de área e RSD (%) para obtenção das curvas analíticas do artesunato e da mefloquina.....	70
Tabela 15:	Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação para as curvas analíticas.....	71

Tabela 16:	Análise de variância para o ajuste do modelo através do método dos mínimos quadrados.....	72
Tabela 17:	Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado.....	73
Tabela 18:	Valores de RSD para a repetibilidade e precisão intermediária.....	75
Tabela 19:	Porcentagem de recuperação média para o artesunato e mefloquina.....	75
Tabela 20:	Valores de LD e LQ.....	76

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

3,5-DNB	ácido 3,5-dinitrobenzóico
ACN	Acetonitrila
ACT	<i>Artemisin based combined therapy</i> ; terapia combinada da artemisinina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BENZ	Ácido benzóico
CE	<i>capillary electrophoresis</i> ; eletroforese capilar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> ; eletroforese capilar de zona
CZE-UV	<i>capillary zone electrophoresis with ultravioleta detection</i> ; eletroforese capilar de zona com detecção ultravioleta
d.e	Diâmetro externo
d.i	Diâmetro interno
DAD	<i>Diode Array Detector</i> ; detector de arranjo de diodos
DFC	dose fixa combinada
EOF	<i>electroosmotic flow</i> ; fluxo eletroosmótico
ep	erro puro
faj	falta de ajuste
G.L.	graus de liberdade
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> ; Cromatografia Eletrocínética Micelar
MeOH	Metanol
MQ	média quadrática
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
reg	regressão

res	resíduos
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> ; Desvio Padrão Relativo
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; docecil sulfato de sódio
SQ	soma quadrática
Tris	(hidroximetil)aminometano
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	ultravioleta
Vis	visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$A_A$	área do analito na amostra
$A_{A+P}$	área do analito na amostra com adição do padrão
$A_P$	área do padrão
$C_A$	concentração do analito
$H_{MÁX}$	altura máxima do pico do analito
$H_{MÍN}$	altura mínima do pico do analito
$L_{ef}$	comprimento efetivo do capilar
$L_{tot}$	comprimento total do capilar
$n_{ENS}$	número de ensaios do planejamento
$n_{PC}$	número de réplicas no ponto central do planejamento
$n_i$	número de repetições no nível i
$r_i$	raio iônico
$S_b$	desvio padrão da linha de base
$t_{ART}$	tempo de migração do artesunato
$t_{MEF}$	tempo de migração da mefloquina
$t_{eo}$	tempo de migração do compostos neutro
$t_m$	tempo de migração do analito
$t_{osm}$	tempo do fluxo eletroosmótico
$\bar{x}$	média aritmética
$y_{im}$	média das determinações repetidas no nível i.
$y_m$	média de todos os valores de y
$\alpha_0, \alpha_1$ e $\alpha_2$	frações de distribuição
$\alpha_i$	fração de distribuição ou grau de ionização
$\mu_{ART}$	mobilidade eletroforética do artesunato
$\mu_{MEF}$	mobilidade eletroforética da mefloquina
$\mu_{ef}$	mobilidade efetiva
$\mu_{eo}$	mobilidade eletroosmótica
$\mu_{ep}$	mobilidade eletroforética
$\mu_j$	mobilidade iônica de cada espécie j
$\mu_{obs}$	mobilidade observada

$v_{eo}$	velocidade do fluxo eletroosmótico
$v_{ep}$	velocidade eletroforética
N	compostos neutros
pH	potencial hidrogeniônico
pKa	constante de dissociação
v/v	volume/volume
$X_1, X_2$ e $X_3$	fatores do planejamento
$E$	campo elétrico
$R \%$	recuperação
$V$	voltagem aplicada
$a$	coeficiente angular
$b$	coeficiente linear
$k$	número de fatores do planejamento
$m$	número de níveis distintos da variável independente
$n = \sum n_i$	número total de medidas
$p$	número de parâmetros do modelo
$q$	carga do analito
$r$	coeficiente de correlação
$s$	desvio padrão
$\eta$	viscosidade



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	MALÁRIA.....	19
1.1.1	<b>Tratamento da Malária.....</b>	21
1.1.2	<b>Antimaláricos.....</b>	24
1.1.3	<b>Métodos analíticos utilizados para a quantificação de artesunato e mefloquina em comprimidos de dose única ou em dose fixa combinada.....</b>	28
1.2	ELETROFORESE CAPILAR.....	30
1.2.1	<b>Princípios da Eletroforese Capilar.....</b>	32
1.3	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	35
1.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
1.4.1	<b>Linearidade.....</b>	38
1.4.2	<b>Seletividade.....</b>	39
1.4.3	<b>Precisão.....</b>	39
1.4.4	<b>Exatidão.....</b>	40
1.4.5	<b>Limite de detecção.....</b>	41
1.4.6	<b>Limite de quantificação.....</b>	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	44
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	44
3.2	PREPARO DA AMOSTRA.....	45
3.3	INSTRUMENTAÇÃO.....	46
3.4	PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	47
3.5	TRATAMENTO DE DADOS.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	49
4.1	SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA.....	49
4.2	OBTENÇÃO DA CURVA DE MOBILIDADE EFETIVA.....	50

4.3	OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO E DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS DE ANÁLISE.....	55
4.4	VALIDAÇÃO.....	69
4.4.1	<b>Linearidade</b> .....	69
4.4.2	<b>Seletividade</b> .....	73
4.4.3	<b>Precisão</b> .....	74
4.4.4	<b>Exatidão</b> .....	75
4.4.5	<b>Limites de detecção e quantificação</b> .....	76
4.5	TRABALHOS FUTUROS.....	76
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diverso de doenças transmissíveis em regiões tropicais e subtropicais, presentes em países da África, Ásia e América Latina, e afetam mais de um bilhão de pessoas (WHO, 2019). As doenças negligenciadas emergem em países com situação econômica desfavorável e de baixo desenvolvimento. A tuberculose, a doença de Chagas, a dengue, e a malária são algumas destas doenças que provocam o aumento das taxas de mortalidade e morbidade em todo mundo (BRASIL, 2013).

### 1.1 MALÁRIA

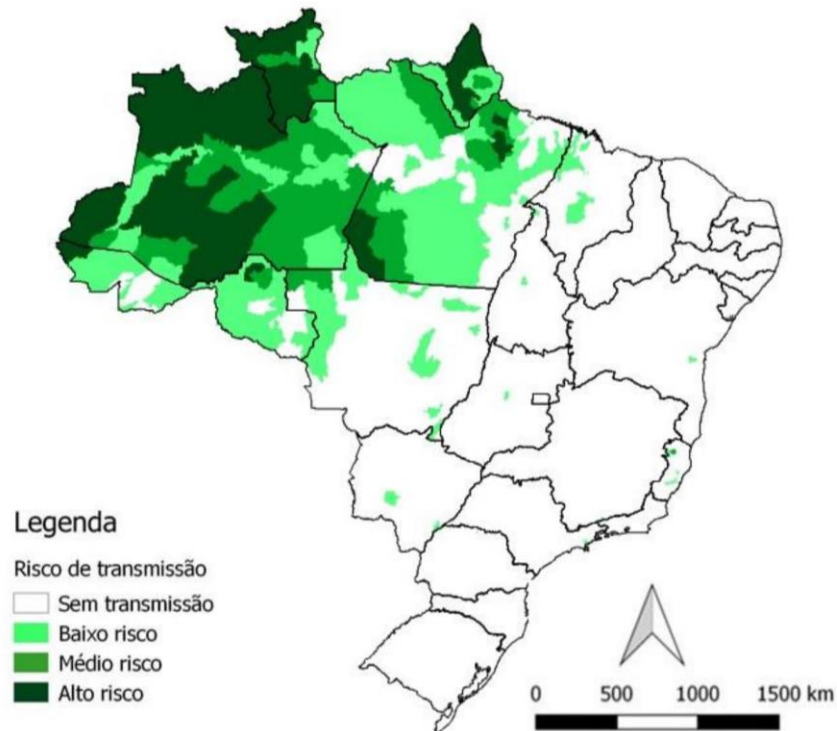
A malária, também chamada de paludismo, febre terçã e maleita, é uma doença infecciosa causada por um parasita do gênero *Plasmodium* (BRASIL, 2017a). As espécies que podem causar a malária humana são o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), o *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), o *Plasmodium ovale* e o *Plasmodium knowlesi*, sendo que *P. malariae* provoca a doença menos grave e o *P. falciparum* é o responsável pelo maior número de mortes (BRASIL, 2017a). No Brasil há três espécies de *Plasmodium* com predominância da espécie *P. vivax*, seguida do *P. falciparum* e da *P. malariae*. O *P. ovale* é encontrado em determinadas regiões do continente africano e o *P. knowlesi* no sudeste asiático (BRASIL, 2017a).

A transmissão da malária ocorre pela picada do mosquito fêmea infectadas do gênero *Anopheles*. Não há transmissão direta da doença entre seres humanos, mas formas raras de contaminação podem ocorrer, como o compartilhamento de seringas infectadas, em transfusões sanguíneas e por via congênita (BRASIL, 2009; BRASIL, 2017a). Os sintomas mais comuns associados à infecção por malária é a tríade febre alta, calafrios e dor de cabeça. Outros sintomas, como dores no corpo, sudorese, náusea, tontura, falta de apetite e cansaço podem acompanhar a tríade sintomática, e nos casos de malária mais graves, os indivíduos ainda podem ter dores abdominais fortes, sonolência e redução da consciência (BRASIL, 2009).

No Brasil, a área endêmica constitui a região amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (BRASIL, 2015). Entretanto, a região extra-amazônica, formada pelo Distrito Federal e os demais estados, também possui casos de malária, podendo ser até mais letais, uma vez que os sintomas, como febre e dor de cabeça, podem ser confundidos com outras doenças, ocasionando

o diagnóstico errado para malária (BRASIL, 2015). Na Figura 1 é mostrado o mapa de risco de infecção por município no Brasil no ano de 2018.

Figura 1: Mapa de risco da malária por município de infecção, em 2018.



Fonte: BRASIL, 2018.

Os esforços do Ministério da Saúde (MS) nos estados e municípios para a prevenção, controle e redução da malária mostraram bons resultados em 2016, pois houve uma redução de 10% dos casos na região amazônica quando comparado a 2015. Porém, constatou-se um aumento de 51% de casos em 2017, em comparação a 2016, percentual que permaneceu o mesmo em 2018. Até o momento, já são mais de 80 mil casos notificados na região amazônica em 2019 (BRASIL, 2019a). Na região extra-amazônica, os casos de malária vêm crescendo desde 2015, com aumentos de 1%, 6% e 51% de casos em 2016, 2017 e 2018, respectivamente. Até o momento, são 299 casos notificados na região extra-amazônica em 2019 (BRASIL, 2019a).

O diagnóstico específico e rápido, o tratamento adequado e imediato e a proteção individual com o uso de repelentes constituem os três fatores primordiais para o controle da malária, sendo que os dois primeiros são fundamentais para a redução da gravidade, letalidade e incidência da doença (WHO, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017 foram investidos cerca de US\$ 3,1 bilhões em medidas para controle ou eliminação da

malária a nível global em países endêmicos, sendo que 71% dos investimentos foram utilizados na região africana, 10% no sudoeste asiático, 7% na América Latina, 4% no mediterrâneo oriental e 4% no ocidente pacífico (WHO, 2018). A população na região africana é a que mais sofre com a doença, e em 2017 concentrou 92% de todos os casos e mortes no mundo, com predomínio da espécie *P.falciparum* em 99,7% dos casos. Na América Latina em 2017, 74,1% dos casos de malária foram ocasionados pelo *P. vivax* (WHO, 2018).

### 1.1.1 Tratamento da Malária

O tratamento da malária com os medicamentos via oral é a melhor forma de reduzir a morbidade e a mortalidade, prevenir a progressão da doença para a forma mais grave, promover a cura com maior grau de eficiência, diminuir a transmissão da doença e dificultar o aparecimento de resistência aos antimaláricos (WHO, 2014).

A escolha do medicamento e do esquema de tratamento é essencial para garantir a melhor adesão dos pacientes. Atualmente, a OMS recomenda a combinação de derivados da artemisinina com outro antimalárico no tratamento da malária causada pelo *P. falciparum*, a chamada terapia combinada da artemisinina (ACT, do inglês *artemisin based combined therapy*) (WHO, 2010; BRASIL, 2010, WHO, 2015). As combinações de fármacos permitem que eles atuem em sinergia ou apresentem diferentes modos de ação para prevenir a evolução da resistência aos medicamentos. Já a malária causada por *P. vivax* pode ser tratada com cloroquina e primaquina, mas quando há resistência a estes fármacos, indica-se a utilização da ACT (WHO, 2010; BRASIL, 2010, WHO, 2015).

As cinco combinações recomendadas pela OMS são: artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina, diidroartemisinina-piperaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina (WHO, 2015). A ACT se baseia na combinação de dois fármacos com mecanismos e tempos de ação diferentes, onde o derivado da artemisinina promove a eliminação do parasito do sangue e o outro fármaco complementar deve apresentar efeito de longa duração (WHO, 2015). Este tipo de terapia tem melhor adesão pelos pacientes pois aumenta a eficácia, proporcionando a redução do índice de transmissão da doença, redução do tempo de tratamento e a diminuição dos riscos de o parasita desenvolver resistência aos fármacos (WHO, 2015). A denominação dose fixa combinada (DFC) é amplamente utilizada para as associações de dois ou mais fármacos em proporções fixas em uma única forma farmacêutica. No caso da malária, as associações são baseadas no uso de dois fármacos, sendo denominada como 2-DFC.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) é uma política nacional do MS que objetiva a redução da letalidade, gravidade e incidência da doença, além da eliminação da transmissão em áreas urbanas (BRASIL, 2010). Por meio do PNCM, o MS é responsável por orientar o tratamento e disponibilizar os medicamentos antimaláricos em unidades do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2017a). Além disso, o Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil (2010) é um manual de terapêutica que apresenta todas as informações necessárias sobre a indicação e uso dos medicamentos preconizados no país (BRASIL, 2010).

Os esquemas de tratamento adotados no Brasil para a malária não complicada causada por *P. falciparum* estão relacionados nas Tabelas 1 e 2. Já a malária não complicada causada pelo *P. vivax* possui o esquema de tratamento descrito na Tabela 3. Em casos de infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax*, recomenda-se o tratamento apresentado na Tabela 4.

Tabela 1: Esquema de tratamento para a infecção por *P. falciparum* com comprimidos de dose fixa combinada de artesunato e cloridrato de mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina (15 mg) em um dia.

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

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 2: Esquema de tratamento para a infecção por *P. falciparum* com comprimidos de dose fixa combinada de artemeter e lumefantrina (20 mg + 120 mg) em três dias e primaquina (15 mg) em um dia.

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

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 3: Esquema de tratamento para as infecções por *P. vivax* com cloroquina (150 mg) em três dias e primaquina (5 mg infantil e 15 mg adulto) em sete dias (esquema curto).

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dias
	Cloroquina	Primaquina Infantil	Cloroquina	Primaquina Infantil	Cloroquina	Primaquina Infantil	Primaquina Infantil
6 – 11 meses 5 – 9 kg	1/2	1	¼	1	1/4	1	1/2
1 – 3 anos 10 – 14 kg	1	2	½	1	1/2	1	1
4 – 8 anos 15 – 24 kg	1	2	1	2	1	2	2
Idade/Peso	Cloroquina	Primaquina Adulto	Cloroquina	Primaquina Adulto	Cloroquina	Primaquina Adulto	Primaquina Adulto
9 – 11 anos 25 – 34 kg	2	1	2	1	2	1	1
12 – 14 anos 35 – 34 kg	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15 anos ≥ 50 kg	4	2	3	2	3	2	2

Fonte: BRASIL, 2010.

Tabela 4: Esquema de tratamento para a infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax* com comprimidos de dose fixa combinada de artemeter e lumefantrina (20 mg + 120 mg) ou artesunato e mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina (5 mg infantil e 15 mg adulto) em sete dias.

Idade/Peso	Esquema para <i>P. falciparum</i> 1° ao 3° dias	Número de comprimidos por dia			
		Primaquina			
		4° dia Infantil	5° dia Infantil	6° dia Infantil	7° ao 10° dias Infantil
6 – 11 meses 5 – 9 kg	Artemeter + Lumefantrina (Tabela 3)	1	1	1	1/2
1 – 3 anos 10 – 14 kg		2	1	1	1
4 – 8 anos 15 – 24 kg		2	2	2	2
Idade/Peso	ou	4° dia Adulto	5° dia Adulto	6° dia Adulto	7° ao 10° dias Adulto
9 – 11 anos 25 – 34 kg	Artesunato + Mefloquina (Tabela 2)	1	1	1	1
12 – 14 anos 35 – 49 kg		2	2	2	1
≥ 15 anos ≥ 50 kg		2	2	2	2

Fonte: BRASIL, 2010.

### 1.1.2 Antimaláricos

Os fármacos antimaláricos podem ser classificados de acordo com a fase do ciclo do parasita que afetam ou em relação ao grupo químico que pertencem, conforme a Tabela 5:



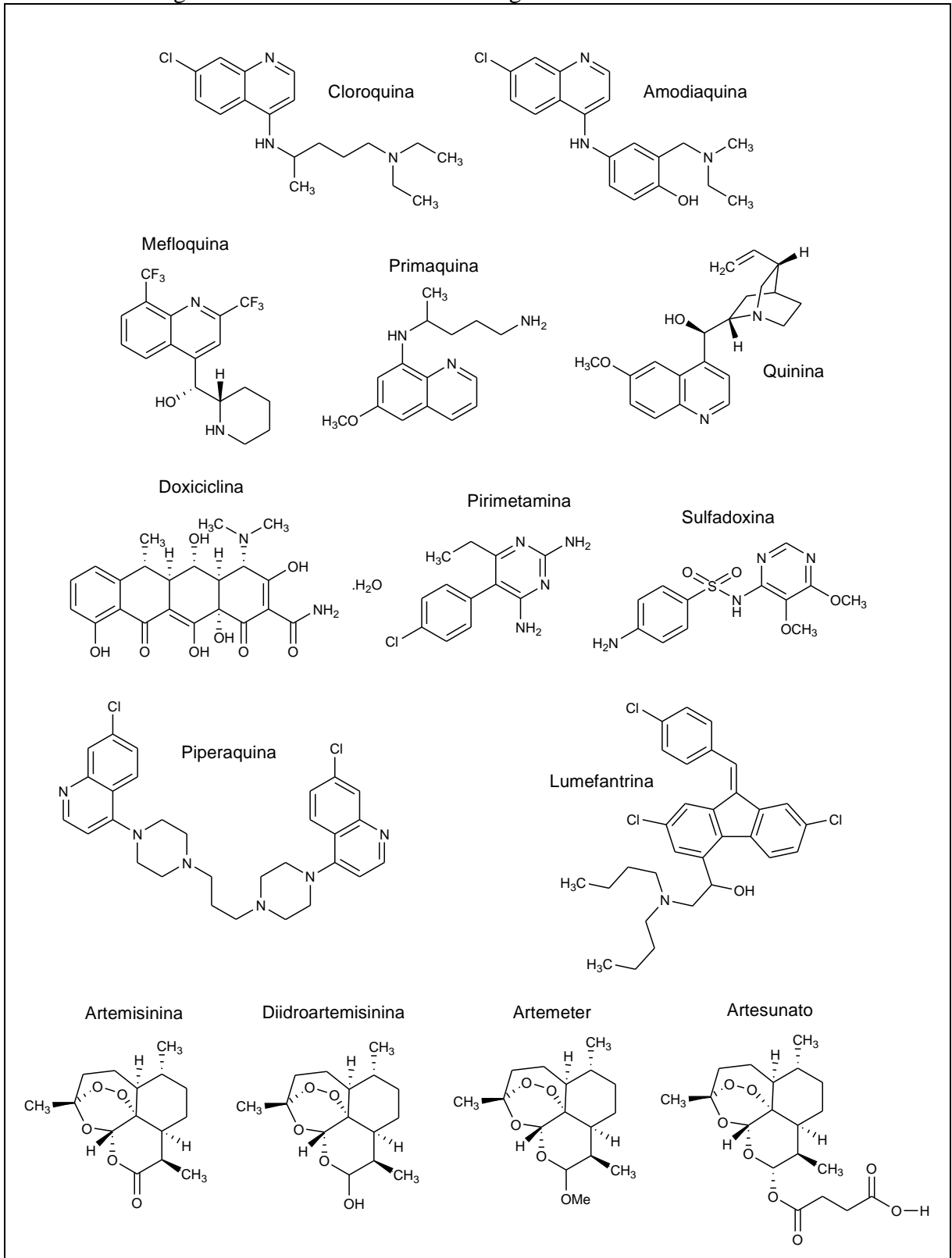
Tabela 5: Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico.

Grupo Químico	Principais Fármacos
4-metanolquinolinas	Quinina, Quinidina, Mefloquina
4-aminoquinolinas	Cloroquina, Hidroxicloroquina, Amodiaquina, Piperaquina
8-aminoquinolinas	Primaquina
Biguanidas	Proguanil, Cloroproguanil
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, Artemeter, Artesunato, Diidroartemisinina
Diaminopirimidinas	Primetamina
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina
Sulfonamidas	Sulfadoxina, Sulfametopirazina
Hidroxinaftoquinonas	Atovaquona
9-fenantrenometanóis	Halofantrina
Tetraciclínas	Doxiciclina, Tetraciclina
Lincosamidas	Clindamicina
Sulfonas	Dapsona

Fonte: WHO, 2010; SWEETMAN, 2009.

Na Figura 2 podem ser observadas as fórmulas estruturais de alguns fármacos antimaláricos.

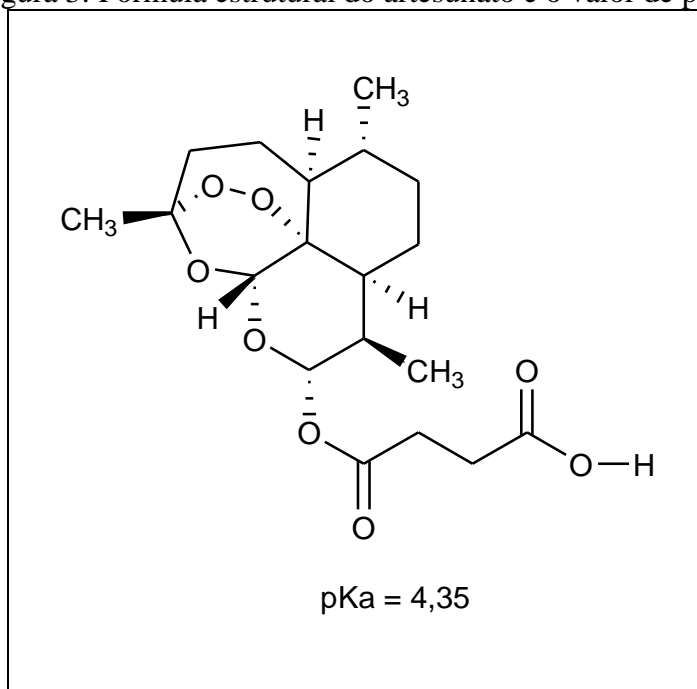
Figura 2: Fórmulas estruturais de alguns fármacos antimaláricos.



Fonte: Elaborada pela autora.

O artesunato, de fórmula molecular  $C_{19}H_{28}O_8$ , Figura 3, é um derivado da artemisinina e apresenta uma lactona sesquiterpênica com uma ligação endoperóxido em sua estrutura. Quimicamente, ele é o éster 1-[(3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-decaidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepina-10-ílico] do ácido butanodióico, sendo sintetizado na forma de um pó fino, cristalino e branco, com massa molar de  $384,42 \text{ g mol}^{-1}$ , ponto de fusão entre 132 e 135 °C, e pKa igual a 4,35 (BRASIL, 2019b; CAS, 2018; THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, 2018). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, é muito pouco solúvel em água, muito solúvel em cloreto de metileno, facilmente solúvel em etanol, metanol e acetona (BRASIL, 2019b).

Figura 3: Fórmula estrutural do artesunato e o valor de pKa.

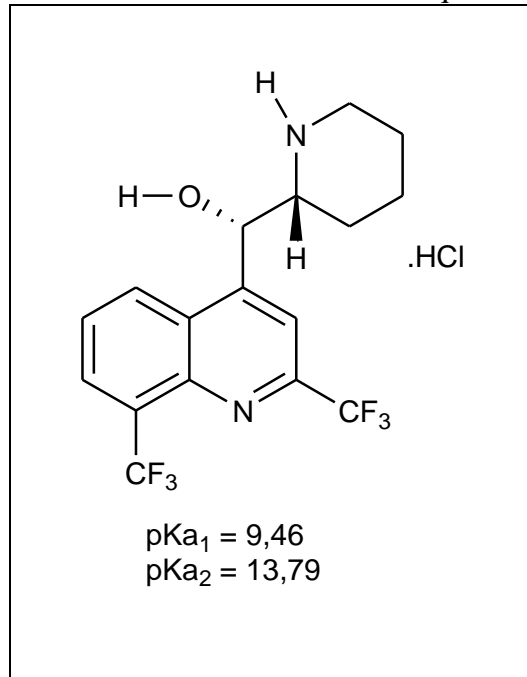


Fonte: Elaborada pela autora.

O cloridrato de mefloquina, de fórmula molecular  $C_{17}H_{16}F_6N_2O \cdot HCl$ , Figura 4, pertence ao grupo das quinolinas. Quimicamente é o cloridrato de ( $\alpha$ S)-rel- $\alpha$ -(2R)-piperidinil-2,8-bis(trifluorometil)-4-quinolinametanol, apresenta-se na forma de pó branco, inodoro, com massa molar de  $414,77 \text{ g mol}^{-1}$ , ponto de fusão entre 259 e 260 °C e, de acordo com a literatura, os valores de pKa's encontrados para a mefloquina são: pKa<sub>1</sub> igual a 9,46 e pKa<sub>2</sub> igual a 13,79 (BRASIL, 2019b; CAS, 2018; THE INTERNATIONAL PHARMACOPEIA, 2018). De acordo com a Farmacopeia Brasileira é pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em acetato de etila e etanol (BRASIL, 2019b). A solução de cloridrato de mefloquina em metanol apresenta máximos de absorção em 222, 283, 304 e 318 nm (THE MERCK, 2013).

A mefloquina vem ganhando destaque por ser mais eficaz no tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* sem complicações quando há resistência aos outros fármacos, como a cloroquina (NOGUEIRA, 2013).

Figura 4: Fórmula estrutural do cloridrato de mefloquina e os valores de pKa.



Fonte: Elaborada pela autora.

A associação artesunato-mefloquina possui baixos índices de efeitos colaterais com uma maior adesão dos pacientes devido a menores doses de comprimidos e menor tempo de tratamento, além de representar progresso no tratamento da malária *falciparum* sem complicações quando há resistência aos outros fármacos (WHO, 2015). Em 2006, foi introduzida apenas no estado do Acre, e com resultados promissores ao longo dos anos, atualmente é a terapia de primeira escolha no Brasil e em diversos países. (WHO, 2010; BRASIL, 2010).

### 1.1.3 Métodos analíticos utilizados para a quantificação de artesunato e mefloquina em comprimidos de dose única ou em dose fixa combinada

Os DFC's proporcionam muitos benefícios terapêuticos, mas também trazem desafios para a indústria farmacêutica, sendo um deles a dificuldade analítica para a quantificação simultânea. É de extrema importância o doseamento destes medicamentos para garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos, uma vez que a administração de uma dose incorreta é

muito prejudicial ao paciente, podendo causar aumento nos efeitos colaterais e na toxicidade, além do aparecimento de resistência e a ineficácia terapêutica

As Farmacopeias Brasileira e Internacional indicam um método cromatográfico, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção em 216 nm, para o doseamento de artesunato em matéria-prima e em comprimidos (BRASIL, 2019b; THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2018). Além disso, na Farmacopeia Internacional ainda há um método volumétrico, mediado pela titulação de neutralização em meio aquoso com fenolftaleína como indicador, para a determinação de artesunato em matéria-prima (THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2018).

Para o doseamento de cloridrato de mefloquina em matéria-prima um método por volumetria de neutralização em meio não-aquoso, com a utilização de ácido perclórico 0,1 M como titulante e determinação do ponto final potenciométricamente, é indicado nas farmacopeias Brasileira, Internacional e Americana (BRASIL, 2019b; THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2018; THE UNITED, 2012). Para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos, as Farmacopeias Brasileira e Internacional descrevem um método cromatográfico, por CLAE com detecção em 283 nm. A Farmacopeia Brasileira ainda relata um método espectrofotométrico de absorção no ultravioleta (UV) para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos (BRASIL, 2019b).

Não há relatos nas farmacopeias citadas para o uso de métodos para a determinação simultânea de artesunato e mefloquina em comprimidos.

Diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de determinar artesunato e mefloquina em formulações farmacêuticas. D'HULST *et al.* (1996) relataram um método para determinação de artesunato e análogos por eletroforese capilar com detecção em baixo comprimento de onda, em 185 nm, e eletrólito constituído por 40 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de lítio em pH 6.8. GABRIELS *et al.* (1999) mostraram um método para determinar artesunato e ácido artelínico por eletroforese capilar de zona, também em 185 nm, utilizando eletrólito constituído de 10 mmol L<sup>-1</sup> de tampão pirofosfato de sódio em pH 8,0 com 10 mmol L<sup>-1</sup> de docecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*). Os autores relataram que a detecção em 185 nm não apresentou boa sensibilidade para o artesunato.

AMIN *et al.* (2012) descreveram um método por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*) para a determinação de artesunato e amodiaquina em comprimidos de 2-DFC, utilizando eletrólito constituído de 25 mmol L<sup>-1</sup> de tampão borato de sódio em pH 9,2 com 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e detecção direta em 214 nm. Os

autores relataram que a separação foi feita em seis minutos e o método é adequado para o controle de qualidade de medicamentos e identificação de fraude ou teor abaixo do padrão.

LAMALLE *et al.* (2012) desenvolveram um método por MEKC para a separação de quinze antimaláricos, entre eles o artesunato, como ferramenta de detecção de fraude em medicamentos. Uma vez que os antimaláricos possuem valores de pKa diferentes, eles não podem ser ionizados em um determinado pH e por isso, a MEKC foi escolhida pois é capaz de separar compostos carregadores e neutros em uma única corrida. O método consiste no eletrólito formado por tampão fosfato em pH 6,6, 29 mM de SDS e 36% de acetonitrila (ACN, do inglês *acetonitrile*), e a detecção foi feita em 210 nm. Os autores relataram que foi possível a separação de treze compostos em oito minutos e a aplicação em formulações farmacêuticas foi satisfatória.

Um método empregando a CLAE para a determinação de artesunato e mefloquina em comprimidos de 2-DFC foi desenvolvido e validado por NOGUEIRA *et al.* (2013), que utilizaram uma coluna C18, fase móvel constituída por tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico) e ACN (50+50, v/v), com detecção em 210 nm para o artesunato, e em 283 nm para a mefloquina. Os autores relataram que o método mostrou-se adequado para análises rotineiras de controle de qualidade dos medicamentos.

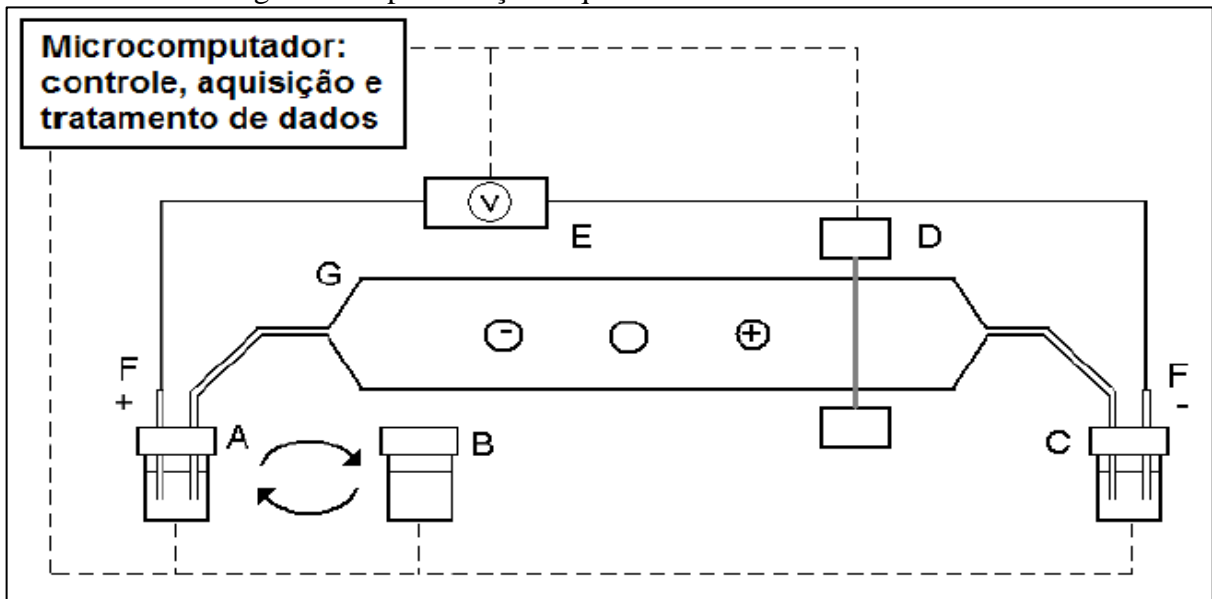
Até o momento, não foram encontrados na literatura relatos evocando o uso da eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis*) para o doseamento simultâneo de artesunato e mefloquina em comprimidos de 2-DFC.

## 1.2 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) é uma técnica analítica de separação, que opera em meio líquido, baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados ou espécies ionizáveis, quando submetidos a influência de um campo elétrico (BAKER, 1995). A separação é conduzida em tubos de dimensões capilares de sílica fundida preenchidos com solução eletrolítica (ou eletrólito), geralmente uma solução tampão. Pequeno volume de amostra, pouco ou nenhum solvente orgânico, curto tempo de análise e a possibilidade de análise simultânea de cátions e ânions em uma mesma análise constituem algumas das principais vantagens da CE (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O sistema básico de CE é mostrado na Figura 5 e consiste de uma fonte de alta tensão, tubos capilares de sílica fundida ou teflon, eletrodos (geralmente de platina), reservatórios para as soluções e um detector adequado ao tipo de análise que se deseja realizar.

Figura 5: Representação esquemática de um sistema de CE.



(A) reservatório de entrada para o eletrólito, (B), reservatório de entrada para a amostra, (C) reservatório de saída para o eletrólito e a amostra, (D) detector, (E) fonte de alta tensão, (F) eletrodos, (G) capilar (o diâmetro foi aumentado para facilitar a visualização).

Fonte: SATO, 2014.

A função da fonte de alta tensão é estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, a partir da conexão com os eletrodos que ficam imersos nos dois reservatórios contendo o eletrólito (BAKER, 1995; TAVARES, 1996). Os capilares são preenchidos com a solução eletrolítica e atuam como um canal de migração e suas extremidades também são imersas nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico (BAKER, 1995; TAVARES, 1996). O capilar é mantido dentro de um cartucho sob temperatura constante, para minimizar os efeitos térmicos (TAVARES, 1996).

A versatilidade da CE é uma grande vantagem devido a disponibilidade de diferentes modos de separação, como a CZE, a MEKC, a cromatografia eletrocinética em microemulsão, a eletroforese capilar em gel, a focalização isoelétrica capilar e a isotacoforese capilar (BAKER, 1995). O modo mais utilizado de eletroforese, a CZE, é baseado nas diferenças entre as mobilidades eletroforéticas dos analitos, sendo aplicado em compostos ionizáveis e não é adequado para a separação de substâncias neutras, que migram em direção ao detector com a mesma velocidade que o fluxo eletroosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*). Na CZE, a amostra é introduzida no capilar previamente preenchido com o eletrólito, geralmente tamponado. Ao aplicar o potencial, gera-se um campo elétrico e os compostos migram em zonas distintas em função da diferença de suas mobilidades eletroforéticas (BAKER, 1995).

Aliada à diversidade de modos de separação, a CE também possui a possibilidade de utilizar vários tipos de detectores, que são escolhidos de acordo com a sensibilidade e a seletividade. A detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis) é a mais empregada e requer a presença de grupos cromóforos na estrutura dos analitos (BAKER, 1995). Para compostos que apresentam baixa ou nenhuma absorvidade no UV, pode ser realizada a detecção indireta por UV, em que o eletrólito deve conter um agente cromóforo em sua composição, com alta absorvidade molar em um comprimento de onda que os analitos não absorvam. O sinal monitorado pelo detector é o do cromóforo e quando o composto que não absorve passa pelo detector, ocorre uma redução na absorbância e, conseqüentemente, uma queda da linha base, apresentando um pico negativo (BAKER, 1995). Nem sempre o comprimento de onda mais adequado para a detecção dos analitos é o de maior absorção do cromóforo, podendo ser ajustado a fim de obter maiores intensidades do sinal (COLOMBARA, 1996).

### 1.2.1 Princípios da Eletroforese Capilar

As separações em CE se baseiam na presença de um fluxo eletricamente induzido, EOF, e os compostos são separados em função da diferença de mobilidade eletroforética, sendo que tendem a migrar para o eletrodo de carga oposta. Ânions são atraídos para o eletrodo de carga positiva, o ânodo, e sem o EOF não percorreriam o capilar até o detector e voltariam para o reservatório de origem. Em condições normais, o EOF, proveniente do ânodo para o catodo (eletrodo de carga negativa), é maior do que as mobilidades eletroforéticas dos compostos negativamente carregados e por isso, estes são deslocados em direção ao detector, permitindo assim a separação de cátions e ânions em uma mesma corrida (BAKER, 1995).

A velocidade do EOF, em  $\text{cm s}^{-1}$ , é dada pela Equação 1:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (1)$$

onde  $\mu_{eo}$  é a mobilidade eletrosmótica e  $E$  é o campo elétrico.

A mobilidade eletrosmótica,  $\mu_{eo}$ , pode ser determinada experimentalmente pela injeção de um composto neutro ou pelo sinal do EOF. A partir do tempo de migração do composto neutro ou do EOF, das dimensões do capilar e voltagem aplicada, a mobilidade eletrosmótica é calculada de acordo com a Equação 2:



$$\mu_{eo} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_{eo}V} \quad (2)$$

onde  $L_{ef}$  e  $L_{tot}$  são, respectivamente, o comprimento efetivo e total do capilar;  $t_{eo}$  é o tempo de migração do composto neutro ou do EOF;  $V$  é a voltagem aplicada.

A mobilidade eletroforética,  $\mu_{ep}$ , é intrínseca do analito e corresponde a sua velocidade em um campo elétrico unitário, conforme Equação 3. Quanto maior for a relação carga-raio,  $\frac{q}{r_i}$ , maior será a mobilidade eletroforética e consequentemente, maior será a velocidade do analito.

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (3)$$

onde  $v_{ep}$  é a velocidade eletroforética;  $E$  é o campo elétrico;  $q$  é a carga do analito;  $\eta$  é a viscosidade do meio;  $r_i$  é o raio iônico.

A mobilidade observada,  $\mu_{obs}$ , é dependente das mobilidades eletroforética do analito e eletroosmótica, conforme Equação 4:

$$\mu_{obs} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (4)$$

Da mesma forma que mobilidade eletroosmótica, a mobilidade observada pode ser calculada experimentalmente através da injeção de uma solução contendo o analito e a partir das dimensões do capilar e da voltagem aplicada, conforme Equação 5:

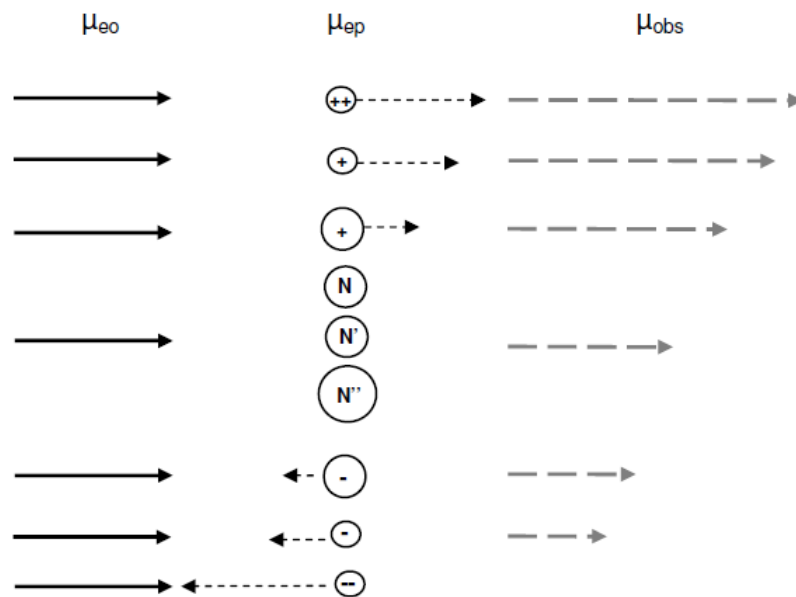
$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_m V} \quad (5)$$

onde  $L_{ef}$  e  $L_{tot}$  são, respectivamente, o comprimento efetivo e total do capilar;  $t_m$  é o tempo de migração do analito;  $V$  é a voltagem aplicada.

Esses princípios e equações podem ser aplicados quando se deseja saber o valor da mobilidade eletroforética de um composto. Uma vez que  $\mu_{eo}$  e  $\mu_{obs}$  são facilmente calculadas experimentalmente pelas Equações 2 e 5, respectivamente, o valor da  $\mu_{ep}$  é encontrada através da Equação 4.

A velocidade e o sentido de migração dependem da relação carga-raio,  $\frac{q}{r_i}$ , e da magnitude das  $\mu_{eo}$  e  $\mu_{ep}$ . Os cátions com maior carga e menor tamanho migram mais rápido, seguidos pelos compostos neutros que se movem pelo capilar na mesma velocidade do EOF, e pelos ânions que são arrastados em direção ao detector pelo EOF (BAKER, 1995). A ordem de migração dos compostos pode ser ilustrada na Figura 6, considerando a direção do EOF do ânodo (esquerda) para o catodo (direita).

Figura 6: Representação esquemática da migração de cátions (+), compostos neutros (N) e ânions (-), de diferentes tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.



Fonte: FARIA, 2010.

O conceito de mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$ , é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos, que existem sob duas formas químicas em equilíbrio, ionizada (com mobilidade zero) e não-ionizada. A mobilidade efetiva pode ser calculada pela definição de Tiselius que considera que qualquer substância  $i$  presente em solução em diferentes formas,  $j$ , relacionadas através de um equilíbrio ácido-base, irá migrar em um campo elétrico como um único soluto, possuindo  $\mu_{ef}$  dada pela Equação 6 (TAVARES, 1996):

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\alpha_j \mu_j) \quad (6)$$

onde  $\alpha_i$  é a fração de distribuição ou grau de ionização e  $\mu_j$  é a mobilidade iônica de cada espécie  $j$ .

Logo, a mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$ , é diretamente proporcional a fração de distribuição de uma molécula,  $\alpha_i$ , e a mobilidade eletroforética,  $\mu_{ep}$ . Sabe-se que  $\alpha_i$  pode ser definida pela constante de dissolução do analito,  $pK_a$ , o que mostra uma dependência indireta entre  $\mu_{ep}$  e o pH do meio, ou seja, com a composição o eletrólito (TAVARES, 1996). A curva de mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$  x pH, é um excelente indicador teórico da condição de pH mais favorável para ocorrer a separação.

Experimentalmente, a mobilidade efetiva pode ser calculada através de uma análise realizada sob determinadas condições experimentais, para cada analito. Os dados importantes para o cálculo são o tempo de migração dos analito e do EOF, além da voltagem aplicada e das dimensões do capilar, que são utilizados nas Equações 2, 5 e 4 para os cálculos de  $\mu_{eo}$ ,  $\mu_{obs}$  e  $\mu_{ep}$ , respectivamente. Com os valores das frações de distribuição,  $\alpha_i$ , a  $\mu_{ef}$  pode ser calculada de acordo com a Equação 6, onde  $\mu_i$  é a  $\mu_{ep}$ .

### 1.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que tem sido bastante utilizada em estudos de otimização de sistemas com duas ou mais variáveis, onde se deseja saber sobre a presença de interação entre elas. A principal vantagem está na obtenção de resultados que eventualmente não seriam alcançados por métodos univariados, em função de ser necessário um número maior de ensaios para chegar na resposta ideal, aumentando também o tempo de otimização do sistema (NETO & SCARMINIO & BRUNS, 2010).

Na execução de um planejamento fatorial, é preciso inicialmente escolher os fatores relevantes para o sistema e em seguida definir os níveis em que cada fator será estudado, ou seja, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos, que são geralmente simbolizados por “+” para o nível alto e “-” para o nível baixo (NETO & SCARMINIO & BRUNS, 2010).

O planejamento Box-Behnken é um planejamento fatorial fracionário especial de três níveis e  $k$  fatores, do tipo  $3^k$ , em que a base é o número de níveis e o expoente  $k$  é o número de fatores. Pode ser aplicado quando se deseja obter informações mais detalhadas sobre o sistema, pois menos experimentos são realizados, em comparação a um planejamento fatorial completo de 3 níveis e  $k$  fatores (FERREIRA *et al.*, 2007).

O número de ensaios,  $n_{ENS}$ , é definido pela Equação 7 (FERREIRA *et al.*, 2007):

$$n_{ENS} = 2k(k - 1) + n_{PC} \quad (7)$$

onde  $k$  é o número de fatores e  $n_{PC}$  é o número de réplicas no ponto central.

Para um planejamento Box-Behnken  $3^3$ , com triplicata no ponto central, temos que  $k = 3$ ,  $n_{PC} = 3$  e  $n = 15$ . Ou seja, temos um total de 15 ensaios e a matriz de planejamento é dada na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz de planejamento Box-Behnken  $3^3$ .

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Resposta
1	-1	-1	0	R <sub>1</sub>
2	1	-1	0	R <sub>2</sub>
3	-1	1	0	R <sub>3</sub>
4	1	1	0	R <sub>4</sub>
5	-1	0	-1	R <sub>5</sub>
6	1	0	-1	R <sub>6</sub>
7	-1	0	1	R <sub>7</sub>
8	1	0	1	R <sub>8</sub>
9	0	-1	-1	R <sub>9</sub>
10	0	1	-1	R <sub>10</sub>
11	0	-1	1	R <sub>11</sub>
12	0	1	1	R <sub>12</sub>
13	0	0	0	R <sub>13</sub>
14	0	0	0	R <sub>14</sub>
15	0	0	0	R <sub>15</sub>

Fonte: FERREIRA *et al.*, 2007.

#### 1.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico é o processo de avaliar se suas características estão de acordo com pré-requisitos preconizados pelas agências reguladoras. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) apresentam resoluções e guias para o

procedimento de validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017b; INMETRO, 2018). Para produtos farmacêuticos, agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão se uniram e definiram parâmetros e metodologias para validação, através da *International Conference on Harmonisation* (ICH) (ICH, 2005). A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) também possui um guia para a validação de métodos analíticos (THOMPSON *et al.*, 2002).

Uma vez que dados analíticos não confiáveis podem levar a decisões incorretas e a prejuízos irreparáveis, é necessário garantir que o desenvolvimento de novos métodos analíticos seja conduzido por uma verificação de qualidade, confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade do método (RIBANI *et al.*, 2004). De acordo com RIBANI *et al.* (2004) “um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado”. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou quando são feitas adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou utilização de diferentes equipamentos (BRITO *et al.*, 2003).

Na literatura existem diversas definições de validação. De acordo com a ANVISA, “a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos” (BRASIL, 2017b). Já o ICH diz que “o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que é adequado para a sua finalidade” (ICH, 2005). Para a IUPAC, “a validação de métodos faz uso de um conjunto de testes que avaliam as suposições nas quais o método analítico se baseia e estabelece e documenta as características de desempenho de um método, demonstrando se é adequado para uma finalidade analítica específica” (THOMPSON *et al.*, 2002).

De acordo com RIBANI *et al.* (2004), dois tipos de validação podem ser descritos, a validação completa e a validação no laboratório. O primeiro procedimento engloba todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial, utilizado para verificar como a metodologia proposta se comporta em vários laboratórios, objetivando estabelecer uma reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004). Já o segundo procedimento, a validação no laboratório, é implementado nas etapas preliminares do desenvolvimento de metodologias e também na publicação de artigos em revistas científicas, em que se avalia todas as características de desempenho de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros analíticos que são considerados para a validação de métodos de separação incluem a linearidade e faixa de aplicação, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez (RIBANI *et al.*, 2004). Neste trabalho foram

avaliados os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção.

### 1.4.1 Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade de obter resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). Recomenda-se que a linearidade seja estabelecida com a utilização de, no mínimo, cinco níveis de concentração diferentes em triplicata (BRASIL, 2017b). A curva analítica é representação gráfica dos sinais analíticos medidos ( $y$ ) em função da concentração do analito ( $x$ ), que mostra uma relação linear, conforme Equação 8:

$$y = a \cdot x + b \quad (8)$$

onde  $a$  é o coeficiente angular,  $b$  é o coeficiente linear,  $y$  é a variável dependente e  $x$  é a variável independente (RIBANI *et al.*, 2004).

A estimativa dos coeficientes da curva de calibração ( $a$  e  $b$ ) e do coeficiente de correlação ( $r$ ) pode ser obtida através do método de regressão linear. O método dos mínimos quadrados é um modelo de regressão onde é possível obter uma curva de calibração que se ajuste ao máximo aos pontos experimentais obtidos (PIMENTEL & NETO, 1996). Um ajuste ideal dos dados é evidenciado pela obtenção de um  $r$  próximo de 1,0, mostrando uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais.

A utilização do método dos mínimos quadrados para tratamento estatístico dos resultados exige que alguns pressupostos sejam satisfeitos. O primeiro pressuposto diz que os erros nas medidas ocorrem devido a flutuações na variável dependente, neste caso, o sinal analítico medido. Essa hipótese é satisfeita preparando-se adequadamente os padrões para a calibração, visando minimizar e evitar possíveis erros adicionais ao processo (PIMENTEL & NETO, 1996). A homocedasticidade é o segundo pressuposto e diz que os erros devem ter variância constante. Para satisfazer esta hipótese, pode ser utilizado o teste F e realiza-se determinações repetidas autênticas de um mesmo padrão, ou seja, cada análise é feita a partir de um padrão preparado independentemente (PIMENTEL & NETO, 1996). O terceiro pressuposto diz que os erros não são correlacionados, ou seja, são independentes. Além da análise dos padrões ser realizada aleatoriamente, a independência é satisfeita quando os padrões

são preparados separadamente e de forma semelhante em cada nível de concentração (PIMENTEL & NETO, 1996). Por fim, o quarto pressuposto diz que os erros devem seguir uma distribuição normal. A normalidade pode ser verificada pelo teste de Shapiro-Wilk (PIMENTEL & NETO, 1996).

Apesar da relevância do coeficiente de correlação, somente a sua avaliação não é suficiente para a obter a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada. É necessário a realização da análise de variância, com testes de falta de ajuste e de significância da regressão (PIMENTEL & NETO, 1996).

### 1.4.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método em identificar ou quantificar o analito, de forma inequívoca, na presença de outros componentes da matriz da amostra, como impurezas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). A seletividade é a primeira etapa no processo de desenvolvimento e validação de um método e pode ser avaliada de diversas maneiras: comparando a matriz sem a substância de interesse com a matriz adicionada com essa substância; comparação do espectro de pico do padrão com o espectro de pico da substância de interesse na amostra, obtidos por detector por arranjo de diodos ou espectrometria de massas; comparando o coeficiente angular da curva analítica com adição de padrão da substância de interesse na amostra com a curva analítica somente dos padrões (RIBANI *et al.*, 2004).

### 1.4.3 Precisão

A precisão é a capacidade do método em avaliar a dispersão dos resultados obtidos entre as análises independentes repetidas das amostras, que foram preparadas conforme apresentado no método analítico a ser validado (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). É avaliada pelo do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), conforme a Equação 9:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (9)$$

onde  $s$  é o desvio padrão e  $\bar{x}$  é a média aritmética das medições.

A precisão deve ser expressa pela repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetitividade é a “concordância entre os resultados de medições

sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição” (RIBANI *et al.*, 2004). As condições de medição incluem mesmo analista, mesmo procedimento, mesmo instrumento, em um intervalo de tempo pequeno. A ANVISA recomenda utilizar, no mínimo, nove determinações contemplando três níveis de concentração em triplicata, ou, no mínimo, seis determinações a uma concentração próxima ao valor esperado (BRASIL, 2017b). A precisão intermediária indica “o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores” (RIBANI *et al.*, 2004). O número de determinações necessárias para avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação feita para a repetitividade (BRASIL, 2017b). A reprodutibilidade é “o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas”, ou seja, diferentes analistas, equipamentos e laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004). É aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos (BRASIL, 2017b).

#### 1.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais do método proposto em relação a um valor de referência (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). A ANVISA recomenda a utilização de, no mínimo, nove determinações contemplando três níveis de concentração em triplicata (BRASIL, 2017b). A exatidão pode ser avaliada por meio de três processos: utilização de materiais de referência certificados, comparação entre o método proposto e um método de referência, ensaios de recuperação e adição de padrão.

A recuperação é a “proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada” (RIBANI *et al.*, 2004). O procedimento de recuperação consiste na adição do padrão do analito, em uma concentração conhecida, à amostra, também chamado de fortificação ou *spiking*. A recuperação é expressa pela relação percentual da quantidade medida do analito com a quantidade do padrão do analito adicionado à amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a recuperação foi avaliada pela fortificação das amostras com o padrão do analito, em três níveis de concentração em triplicata. A recuperação foi determinada pela da Equação 10:



$$R \% = \frac{A_{A+P} + A_A}{A_P} \cdot 100 \quad (10)$$

onde  $A_{A+P}$  é a área do analito na amostra com adição do padrão,  $A_A$  é a área do analito na amostra e  $A_P$  é a área do padrão (FARIA & SOUZA & OLIVEIRA, 2008).

#### 1.4.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). O LD pode ser determinado pela relação sinal/ruído, pelo método visual ou pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). A relação sinal/ruído é determinada comparando os sinais medidos a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito com um branco para estabelecer a concentração mínima em que o analito pode ser detectado (ICH, 2005).

Neste trabalho, o LD foi avaliado pela relação sinal/ruído e calculado pela Equação 11:

$$LD = \frac{3 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{MÁX} - H_{MÍN}} \quad (11)$$

onde  $s_b$  é o desvio padrão da linha de base,  $C_A$  é a concentração do analito,  $H_{MÁX}$  é a altura máxima do pico do analito e  $H_{MÍN}$  é a altura mínima do pico do analito (FARIA & SOUZA & OLIVEIRA, 2008).

#### 1.4.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada, sob condições experimentais estabelecidas (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017b). O LQ pode ser determinado pelos mesmos métodos que o LD, ou seja, pela relação sinal/ruído, pelo método visual ou pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste trabalho, o LQ foi avaliado pela relação sinal/ruído e calculado pela Equação 12:

$$LD = \frac{10 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{MÁX} - H_{MÍN}} \quad (12)$$

onde  $s_b$  é o desvio padrão da linha de base,  $C_A$  é a concentração do analito,  $H_{MÁX}$  é a altura máxima do pico do analito e  $H_{MÍN}$  é a altura mínima do pico do analito (FARIA & SOUZA & OLIVEIRA, 2008).

## 2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados o objetivo geral do trabalho, bem como os objetivos específicos.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, otimizar e validar métodos analíticos para a determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em formulações farmacêuticas de dose fixa combinada por eletroforese capilar de zona com detecção ultravioleta (CZE-UV).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção da curva de mobilidade efetiva para o artesunato e mefloquina;
- Otimização do eletrólito de corrida;
- Otimização das condições eletroforéticas de análise por meio de um planejamento de experimentos;
- Avaliação de parâmetros de validação para o método analítico desenvolvido.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e os padrões utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, USA). Metanol (MeOH) UV/HPLC e hidróxido de sódio P.A. (NaOH) foram obtidos na Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido acético P.A. (HAc), ácido clorídrico P.A. (HCl), ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB), fosfato de sódio dibásico P.A. anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato de sódio monobásico P.A. anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e acetato de amônio P.A. ( $\text{AcNH}_4$ ) foram adquiridos na Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Acetato de sódio trihidratado (AcNa) foi adquirido na Neon Comercial (São Paulo, Brasil). Ácido benzóico (BENZ) foi adquirido na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Artesunato Substância Química de Referência (Farmacopeia Brasileira, lote 1085) e cloridrato de mefloquina (USP, lote F1J249) foram adquiridos e utilizados. As matérias-primas de artesunato e de cloridrato de mefloquina foram fornecidas pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brasil) e pelo laboratório CEDAFAR da UFMG.

Os comprimidos de dose fixa combinada contendo 100 mg de artesunato e 220 mg de cloridrato de mefloquina correspondente a 200 mg de mefloquina base livre, lote 1720068, foram fornecidos pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções estoques individuais dos fármacos foram preparados em metanol e estocadas na geladeira até o momento das análises, nas concentrações de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  para o artesunato e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para o cloridrato de mefloquina. As misturas de padrões foram preparadas no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques, em metanol.

Solução de NaOH foi preparada na concentração de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  para os condicionamentos do capilar inicial e entre corridas.

Solução do tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), em pH 7,2, foi preparada na concentração de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foi diluída para  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Solução do tampão acetato ( $\text{HAc}/\text{AcNa}$ ), em pH 4,5, foi preparada na concentração de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foi diluída para  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Solução de eletrólito contendo tampão Tris/HCl, em pH 8,0, foi preparada na concentração de  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foi diluída para  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Solução de eletrólito contendo tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e ácido benzóico (BENZ), em pH 7,2, foi preparada na concentração de  $60/20 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foi diluída para  $30/10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Solução de eletrólito contendo tampão acetato ( $\text{HAc}/\text{AcNH}_4$ ) e ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB), em pH 4,5, foi preparada na concentração de  $60/10 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foi diluída para  $30/5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Solução de eletrólito contendo o tampão Tris/3,5-DNB, em pH 8,0, foi preparada na concentração de  $60/30 \text{ mmol L}^{-1}$ , em água deionizada, e estocado em geladeira. No dia da realização das análises, foram feitas as diluições para  $20/10 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $25/12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $30/15 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 3.2 PREPARO DE AMOSTRA

A fim de verificar de modo qualitativo o comportamento dos analitos na amostra, um comprimido foi pesado, pulverizado, e uma alíquota de 50 mg do comprimido foi retirada, solubilizada em metanol e transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionou-se 25 mL de metanol e a solução foi mantida em banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol. As concentrações teóricas dos fármacos nessa condição são  $212 \text{ mg L}^{-1}$  de artesunato e  $424 \text{ mg L}^{-1}$  de cloridrato de mefloquina. Antes de ser injetado, a amostra foi filtrada em filtro de membrana PFTE  $0,45 \mu\text{m}$ .

Para avaliação dos parâmetros de seletividade, precisão e recuperação, foi preparada uma solução estoque da amostra. Vinte comprimidos, contendo 100 mg de artesunato e 220 mg de cloridrato de mefloquina, foram pesados e pulverizados em almofariz e pistilo. Uma porção do pó dos comprimidos equivalente a 50 mg de artesunato foi pesada e transferida para um

balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionou-se 25 mL de metanol e a solução foi mantida em banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol. As concentrações teóricas dos fármacos nessa condição são 1000 mg L<sup>-1</sup> de artesunato e 2200 mg L<sup>-1</sup> de cloridrato de mefloquina. Antes de ser injetada, a amostra foi filtrada em filtro de membrana PFTE 0,45 µm e foram realizadas as diluições necessárias para cada teste.

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação, vinte comprimidos, contendo 100 mg de artesunato e 220 mg de cloridrato de mefloquina, foram pesados e pulverizados em almofariz e pistilo. Uma porção do pó dos comprimidos equivalente a 2 mg de artesunato foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionou-se 5 mL de metanol e a solução foi mantida em banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol. As concentrações teóricas dos fármacos nessa condição são 200 mg L<sup>-1</sup> de artesunato e 440 mg L<sup>-1</sup> de cloridrato de mefloquina. Antes de ser injetada, a amostra foi filtrada em filtro de membrana PFTE 0,45 µm. As amostras foram preparadas em seis réplicas autênticas.

### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo 7100 CE (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) disponível do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês, *diode array detector*) e *software* para aquisição e tratamento dos dados OpenLAB CDS Chem Station Edition (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

Nos testes iniciais, a temperatura do capilar foi mantida em 25 °C, as amostras foram injetadas hidrodinamicamente, 30 mbar durante 10,0 s, e o sistema de eletroforese foi operado sob polaridade normal, voltagem constante de +25 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida revestido externamente com poliamida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo), com 75 µm d.i. x 375 µm d.e. As análises foram realizadas em comprimentos de onda de 192, 214 e 220 nm.

No planejamento experimental, a temperatura do capilar foi variada em 20, 22,5 e 25 °C, as amostras foram injetadas hidrodinamicamente, 30 mbar durante 10,0 s, e o sistema de eletroforese foi operado sob polaridade normal, voltagem variando de +25, +27,5 e +30 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida revestido externamente com poliamida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo),

com 50  $\mu\text{m}$  d.i. x 375  $\mu\text{m}$  d.e. As análises foram realizadas em comprimentos de onda de 214 nm e 220 nm.

No método otimizado, a temperatura do capilar foi mantida em 22,5 °C, as amostras foram injetadas hidrodinamicamente, 30 mbar durante 10,0 s, seguida da injeção do eletrólito, 30 mbar por 10,0 s, e o sistema de eletroforese foi operado sob polaridade normal, voltagem de +30 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida revestido externamente com poliamida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo), com 50  $\mu\text{m}$  d.i. x 375  $\mu\text{m}$  d.e. As análises foram realizadas em comprimentos de onda de 214 nm.

Os espectros UV-Vis foram realizados em um espectrofotômetro modelo UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com emissão de duplo feixe simultâneo, usando celas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

### 3.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Ao ser utilizado um novo capilar, este era condicionado inicialmente com *flush* de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 30 minutos, seguido de água deionizada por 20 minutos e solução de eletrólito por 20 minutos.

No início do dia de trabalho o capilar era condicionado com solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 10 minutos, água deionizada por 10 minutos e solução de eletrólito por 15 minutos.

O condicionamento entre as análises foi realizado com *flush* de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 1 minuto, MeOH por 1 minuto, água deionizada por 1 minuto e solução de eletrólito por 3 minutos. A utilização de metanol foi necessária para evitar possíveis processos de adsorção do analito na parede interna do capilar, o que acarretaria no alargamento dos picos.

Ao final do dia, o capilar foi lavado com solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 10 minutos e água deionizada por 10 minutos, sendo mantido no cartucho fora do equipamento de eletroforese capilar.

As micropipetas foram calibradas frequentemente para minimizar possíveis erros sistemáticos, de forma a não prejudicar a exatidão e a precisão. Os eletrodos de platina foram lavados a cada nova semana de trabalho com água deionizada por 15 minutos e álcool isopropílico por 15 minutos em banho ultrassônico.

### 3.5 TRATAMENTO DE DADOS

Os programas Microsoft Excel e Origin Pro foram utilizados para o tratamento estatístico dos dados.

O programa Peak Master foi utilizado para obtenção dos valores de pKa e das mobilidades eletroforéticas do ácido benzóico (BENZ), do ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB) e do Tris.



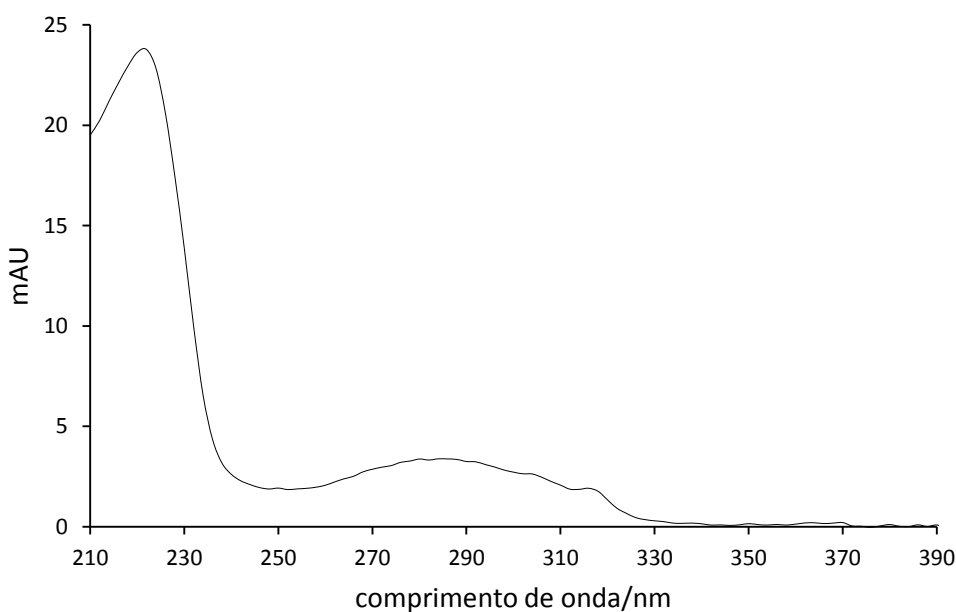
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados e as discussões sobre o trabalho desenvolvido.

### 4.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA

Para encontrar o comprimento de onda mais adequado para a detecção do artesunato e da mefloquina foi realizado um estudo espectrofotométrico na região UV-Vis. Na Figura 7 é apresentado o espectro de absorção da mefloquina e pode-se observar que o comprimento de onda próximo a 220 nm favorece a sua detecção.

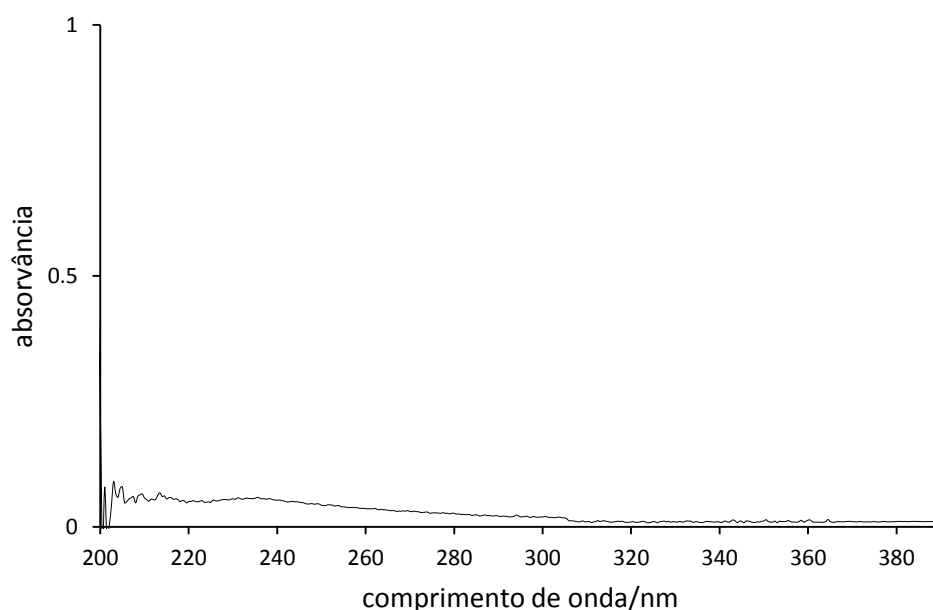
Figura 7: Espectro de absorção do cloridrato de mefloquina, na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , obtido durante a análise por eletroforese capilar.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 8 é apresentado o espectro de absorção do artesunato. Tem-se a confirmação da baixa absorvidade do fármaco, por não ter grupo cromóforo em sua estrutura, e assim a sua detecção direta no UV torna-se difícil. Entretanto, D'HULST *et al.* (1996) conseguiram determiná-lo em 185 nm.

Figura 8: Espectro de absorção do artesunato na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, decidiu-se por realizar testes preliminares com detecção direta no mais baixo comprimento de onda permitido pelo equipamento, 192 nm, para o artesunato, e para a mefloquina foi utilizada a detecção direta em 220 nm.

#### 4.2 OBTENÇÃO DA CURVA DE MOBILIDADE EFETIVA

A escolha do eletrólito é fundamental para que a separação dos analitos seja realizada na CZE, pois uma variação no pH do tampão constituinte do eletrólito pode afetar o EOF e a mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$ . A curva de mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$  x pH, discutida no item 2.1, é bastante útil para selecionar a faixa de pH adequada à separação, que é quando as  $\mu_{ef}$  dos analitos são diferentes. Uma boa simetria dos picos geralmente é obtida quando a mobilidade do analito é próxima da mobilidade do contra-íon do tampão, que é escolhido através da avaliação da curva de mobilidade (SPUDEIT *et al.*, 2016).

Para a obtenção da curva de mobilidade, inicialmente foram calculadas as mobilidades eletroforéticas do artesunato,  $\mu_{ART}$ , e da mefloquina,  $\mu_{MEF}$ . O cálculo de  $\mu_{ART}$  foi feito baseado no trabalho de GABRIELS *et al.* (1999). As mobilidades  $\mu_{eo}$ ,  $\mu_{obs}$  e  $\mu_{ART}$  foram calculadas pelas Equações 2, 5 e 4, respectivamente. Os valores de voltagem aplicada, comprimento do capilar total e efetivo, tempo de migração do analito e do EOF, e  $\mu_{ART}$  podem ser visualizados na Tabela 7, onde  $t_{osm}$  é o tempo de migração do EOF.

Tabela 7: Valores para o cálculo da  $\mu_{ART}$ .

$t_{ART}$	$t_{osm}$	$V$	$L_{tot}$	$L_{ef}$	$\mu_{ART}$
(min)	(min)	(kV)	(cm)	(cm)	( $\times 10^{-5}$ , $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ )
4,586	3,129	15	60	56	-37,907

Fonte: Elaborada pela autora.

O cálculo de  $\mu_{MEF}$  foi feito após a injeção de uma solução do analito, em que as condições experimentais de dimensões do capilar, voltagem e temperatura foram definidas previamente. Com a obtenção dos valores dos tempos de migração do analito e do EOF (composto neutro), as mobilidades  $\mu_{eo}$ ,  $\mu_{obs}$  e  $\mu_{MEF}$  foram calculadas pelas Equações 2, 5 e 4, respectivamente. Os valores de voltagem aplicada, comprimento do capilar total e efetivo, tempo de migração do analito e do EOF, e  $\mu_{MEF}$  podem ser visualizados na Tabela 8.

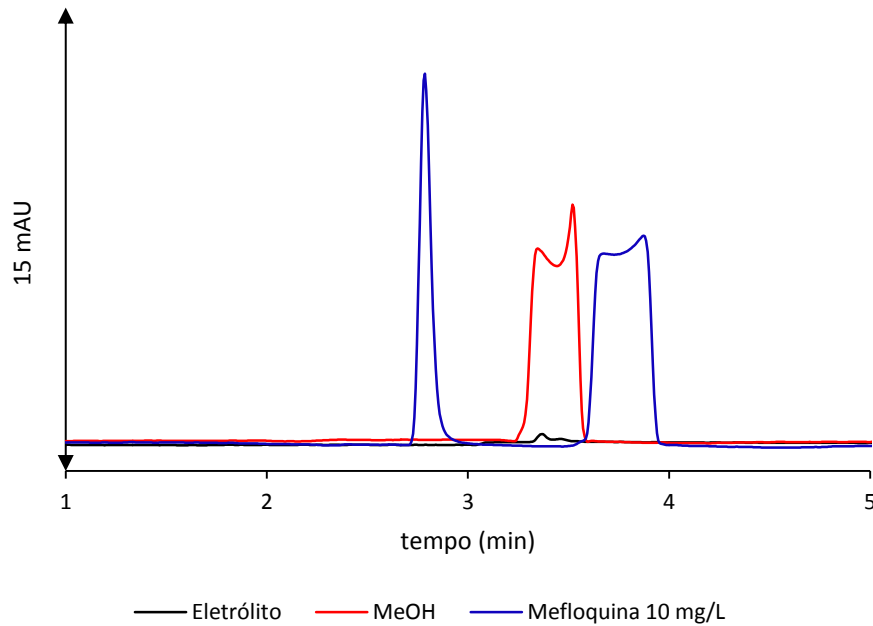
Tabela 8: Valores para o cálculo da  $\mu_{MEF}$ .

$t_{MEF}$	$t_{osm}$	$V$	$L_{tot}$	$L_{ef}$	$\mu_{MEF}$
(min)	(min)	(kV)	(cm)	(cm)	( $\times 10^{-5}$ , $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ )
2,741	3,820	25	48,5	40	13,328

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Na Figura 9 são apresentados os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da mefloquina (linha azul). O pico (em azul) em 2,78 minutos é referente a mefloquina.

Figura 9: Eletroferogramas do eletrólito, metanol e mefloquina na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólito constituído de 20 mmol L<sup>-1</sup> de tampão acetato, em 220 nm.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75 μm d.i., 375 μm d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0s; voltagem de +25 kV; temperatura de 25 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o conceito de mobilidade efetiva discutido no item 2.1, na separação de compostos que possuem caráter de ácido fraco, deve-se considerar a molécula ionizada e a não ionizada (com mobilidade zero), e a mobilidade efetiva é calculada pela Equação 6, considerando as frações de distribuição,  $\alpha$ , e a mobilidade eletroforética do analito,  $\mu_{ep}$ . Para um ácido fraco HA, no caso do artesunato, os valores de  $\alpha_0$  e  $\alpha_1$  são dados pelas equações 13 e 14, e para um ácido fraco H<sub>2</sub>A, no caso da mefloquina, os valores de  $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são dados pelas equações 15, 16 e 17.

$$\alpha_0 = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \quad (13)$$

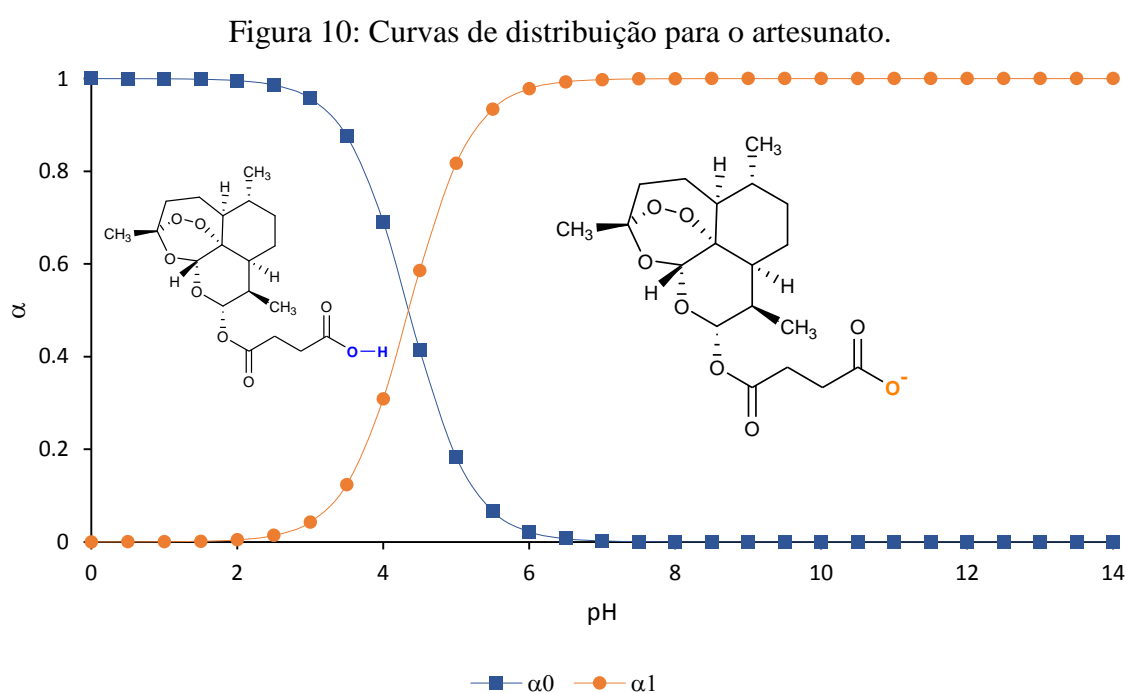
$$\alpha_1 = \frac{10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \quad (14)$$

$$\alpha_0 = \frac{10^{-2pH}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1}10^{-pH} + 10^{-pKa1}10^{-pKa2}} \quad (15)$$

$$\alpha_1 = \frac{10^{-pH} 10^{-pKa1}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1} 10^{-pH} + 10^{-pKa1} 10^{-pKa2}} \quad (16)$$

$$\alpha_2 = \frac{10^{-pKa1} 10^{-pKa2}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa1} 10^{-pH} + 10^{-pKa1} 10^{-pKa2}} \quad (17)$$

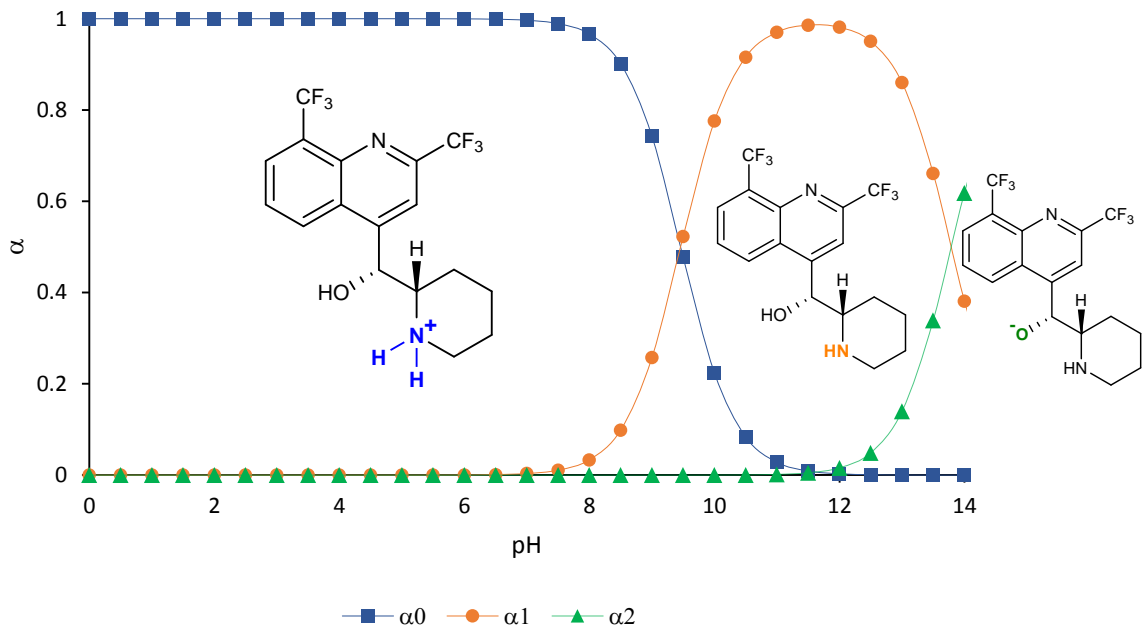
Na Figura 10 é mostrada as curvas de distribuição do artesunato, onde observamos que até pH 3,0 a forma predominante do composto é a neutra e em pH acima de 6,0 tem-se um comportamento aniônico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Da mesma forma para a mefloquina, até pH 8,5 a forma predominante é a catiônica, ou seja  $H_2A^+$ , e em pH entre 10,5 e 12,5 temos a predominância da forma neutra. Somente em pH próximo de 14 que a mefloquina se comportará como ânion, como pode ser observado nas curvas de distribuição da Figura 11.

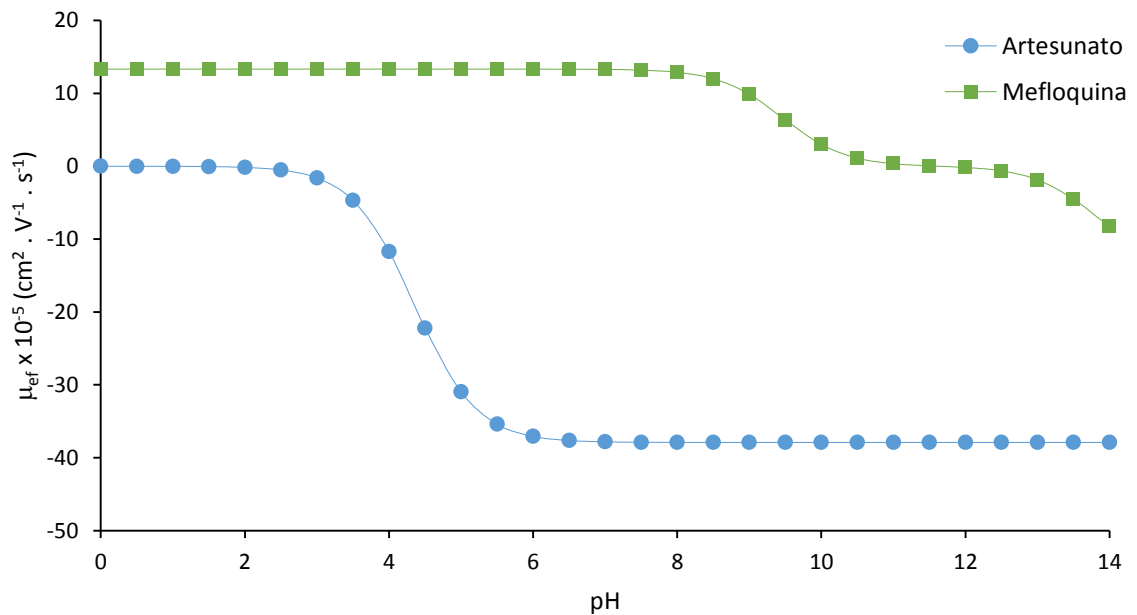
Figura 11: Curvas de distribuição para a mefloquina.



Fonte: Elaborada pela autora

Com os valores de  $\mu_{MEF}$ ,  $\mu_{ART}$  e suas respectivas frações de distribuição, a  $\mu_{ef}$  pode ser calculada de acordo com a Equação 6, onde  $\mu_i$  corresponde à mobilidade eletroforética do analito. Na Figura 12 são mostradas as curvas de mobilidade efetiva da mefloquina e do artesunato.

Figura 12: Curvas de mobilidade efetiva para a mefloquina e o artesunato.



Fonte: Elaborada pela autora.

A observação das curvas fornece uma avaliação preliminar de uma faixa de pH apropriada para ocorrer a separação, ou seja, onde a diferença entre as mobilidades é maximizada (SPUDEIT *et al.*, 2016). Pode-se confirmar os mesmos aspectos já observados nas curvas de distribuição: o artesunato apresenta comportamento neutro em  $\text{pH} < 2,5$  e aniônico em  $\text{pH} > 3,0$ , e a mefloquina apresenta comportamento catiônico em  $\text{pH} < 10,5$ , neutro na faixa de  $11 < \text{pH} < 12,5$  e aniônico em  $\text{pH} > 13,0$ . Dessa forma, o valor ideal de pH está na faixa de 6,0 a 8,0, pois ambos os analitos estão totalmente ionizados, indicando que a diferença de mobilidade entre eles é maximizada. Com isso, decidiu-se por realizar o estudo preliminar da separação dos fármacos no intervalo de pH de 6,0 a 8,0.

#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO ELETRÓLITO E DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS DE ANÁLISE

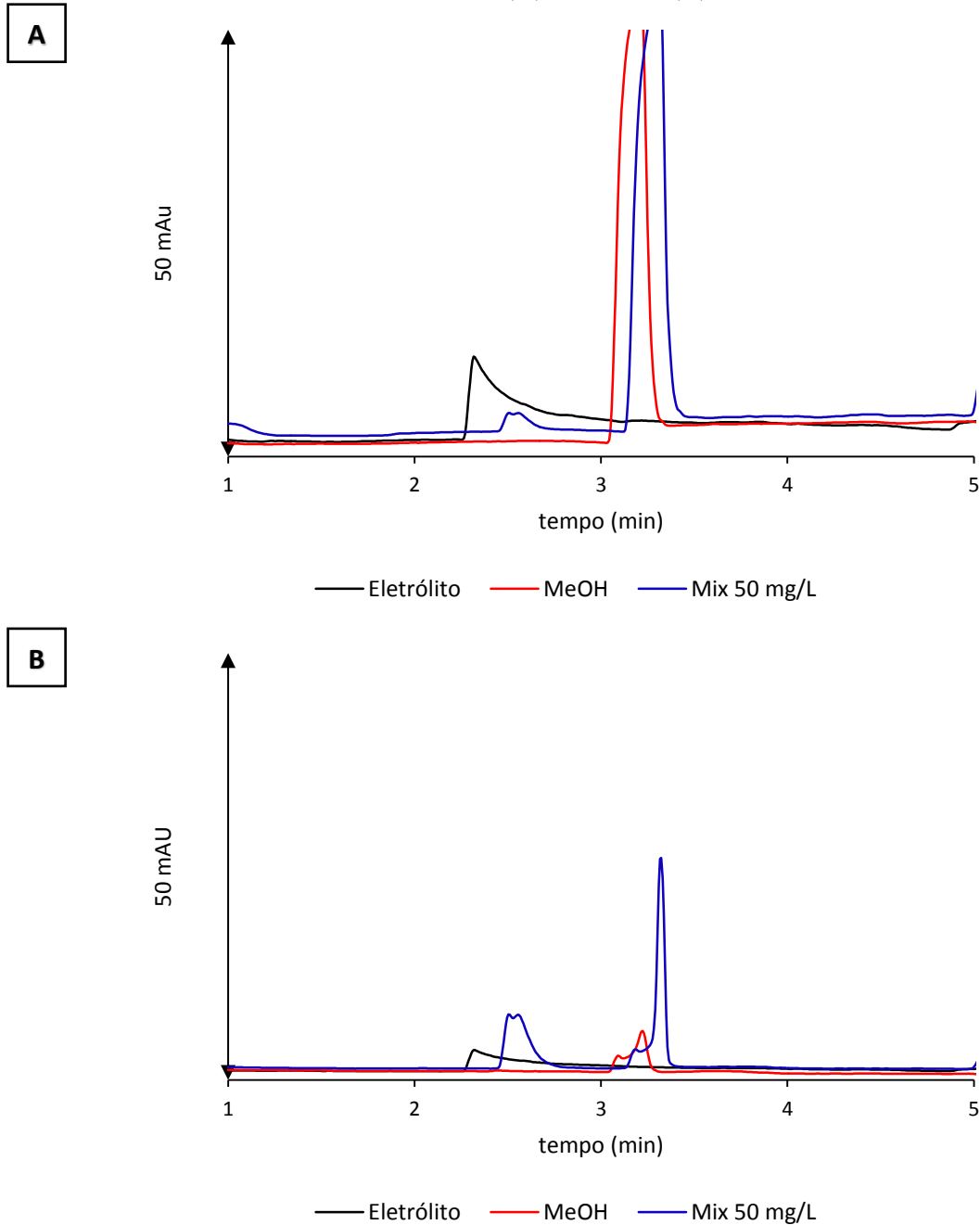
O estudo inicial para a seleção do eletrólito foi baseado na curva de mobilidade efetiva dos fármacos versus pH (Figura 12) e a faixa de pH selecionada para o estudo foi o intervalo de pH 6,0 a 8,0. Inicialmente, foi proposto a utilização da detecção direta por UV, para ambos os fármacos, sendo escolhidos dois eletrólitos para o estudo do comportamento da separação da mistura dos fármacos artesunato e mefloquina: tampão fosfato em pH 7,2 e tampão Tris/HCl em pH 8,0. O estudo foi realizado em condições instrumentais constantes, com voltagem positiva de 25 kV, injeção hidrodinâmica de 30 mbar por 10 s, a temperatura do capilar foi mantida em 25 °C e a detecção foi realizada em 192 e 220 nm.

Na Figura 13 pode-se observar os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da separação dos componentes da mistura de fármacos (linha azul) quando se utiliza 20 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato em 192 nm (A) e em 220 nm (B). Não foi possível identificar nenhum pico referente aos analitos em ambos comprimentos de onda, pois os picos que aparecem no eletroferograma da mistura de fármacos também estão presentes no eletroferograma do eletrólito, indicando que são referentes a ele. Mesmo em comprimento de onda baixo, em 192 nm, não foi possível identificar o artesunato pela detecção direta

Na Figura 14 são apresentados os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da separação dos componentes da mistura de fármacos (linha azul) quando se utiliza 20 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Tris/HCl em 192 nm (C) e em 220 nm (D). Em ambos os comprimentos de onda, observamos um pico em 1,85 minutos que é referente a mefloquina. Esse fato é coerente com a ordem de migração de compostos positivamente carregados

migrarem antes do EOF (pico em 2,25 minutos). Mesmo em comprimento de onda baixo, em 192 nm, não foi possível identificar o artesunato pela detecção direta.

Figura 13: Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólito constituído por 20 mmol L<sup>-1</sup> tampão fosfato, em 192 nm (A) e 220 nm (B).

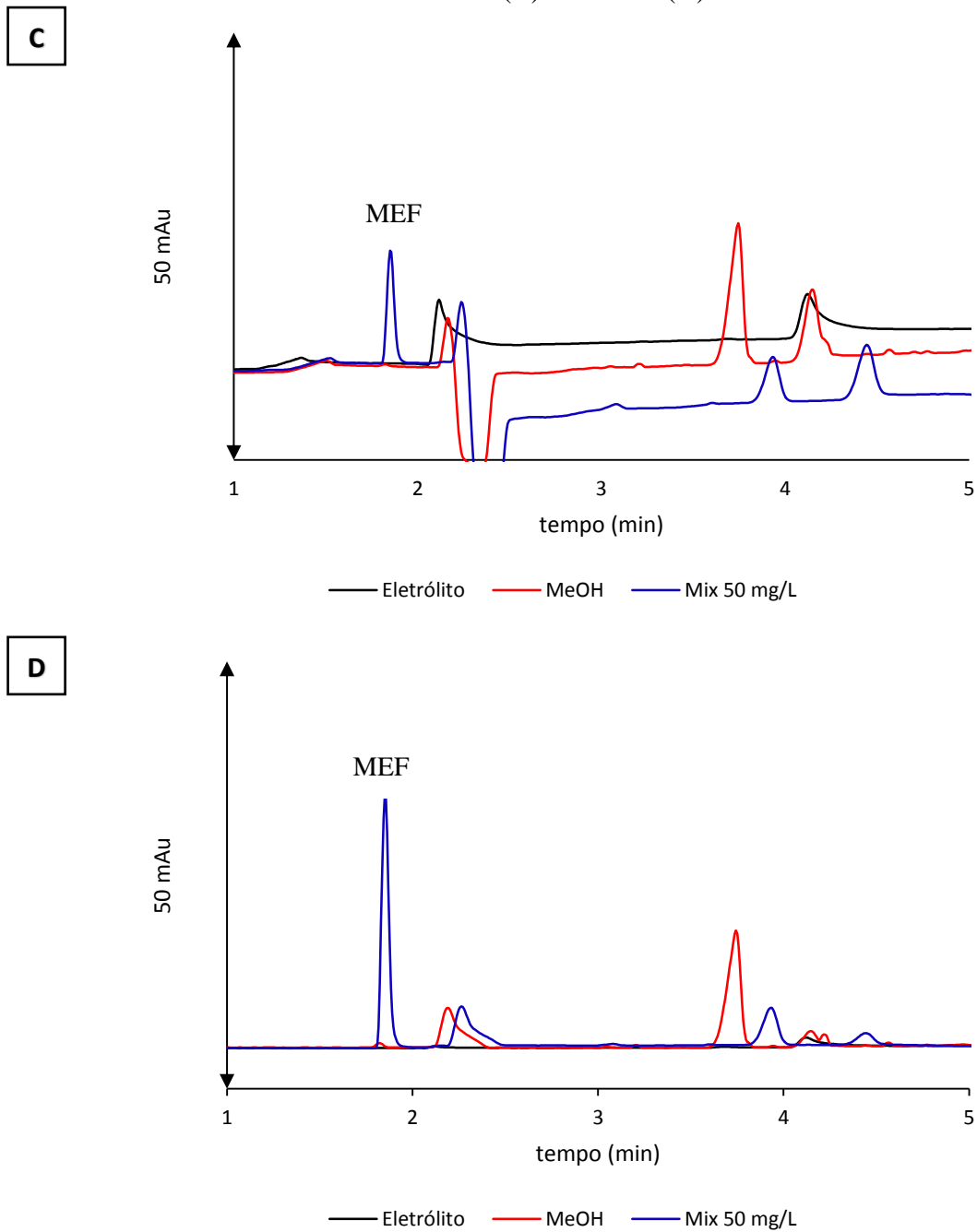


Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75 µm d.i., 375 µm d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 14: Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólito constituído por 20 mmol L<sup>-1</sup> tampão Tris/HCl, em 192 nm (C) e 220 nm (D).



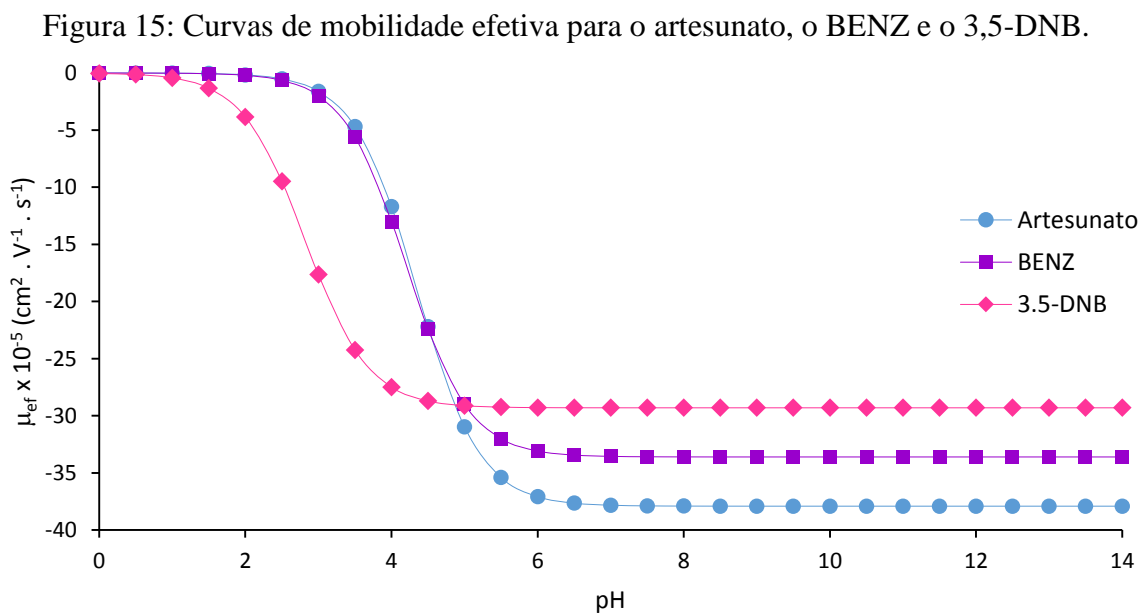
Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75  $\mu\text{m}$  d.i., 375  $\mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +25 kV; temperatura de 25 °C. MEF: mefloquina

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi proposto então a detecção indireta por UV para o artesunato. Neste modo de detecção, o eletrólito deve conter um agente cromóforo em sua composição, com alta absorvidade molar em um comprimento de onda que os analitos não absorvam. Para isso,

foram testados três eletrólitos diferentes: (I) tampão fosfato em pH 7,2 com ácido benzóico (BENZ), (II) tampão acetato em pH 4,5 com ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB) e o (III) tampão Tris/3,5-DNB em pH 8,0. A escolha dos cromóforos BENZ e 3,5-DNB foi realizada por de simulações no *software* Peak Master, em que é possível obter os valores das mobilidades eletroforéticas dos compostos. Conforme discutido anteriormente, uma boa simetria dos picos é obtida quando a mobilidade do analito é próxima da mobilidade do contra-íon do tampão, e neste caso, o melhor composto cromóforo é aquele que apresentar mobilidade eletroforética próxima a do analito (COLOMBARA, 1996; SPUDEIT *et al.*, 2016).

Na Figura 15 são mostradas as curvas de mobilidade do artesunato, do BENZ e do 3,5-DNB. Devido à proximidade da mobilidade do artesunato com as mobilidades dos agentes cromóforos, podemos confirmar que ambos podem ser utilizados para a determinação do artesunato.

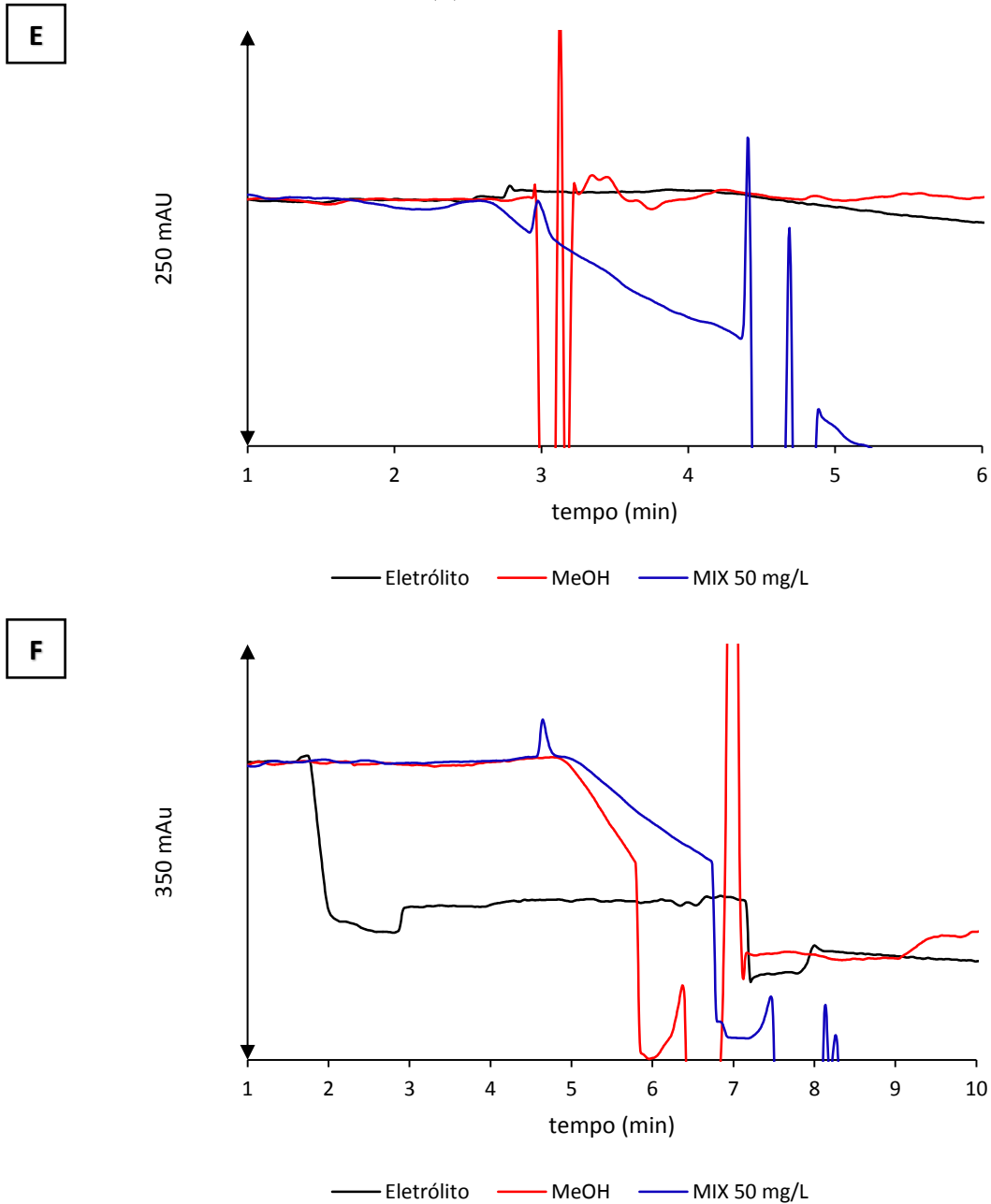


Fonte: Elaborada pela autora.

Dos testes realizados com os eletrólitos I e II não foi possível obter resultados relevantes, pois a linha de base não ficou estável em função de uma pequena queda de corrente no decorrer das análises. Na Figura 16 pode-se observar os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da separação dos componentes da mistura de fármacos (linha azul) quando se utiliza  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de BENZ (E) e  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão acetato com  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de 3,5-DNB (F), ambos em  $220 \text{ nm}$ . Nas duas condições, é possível identificar um pico em  $2,98$  minutos e  $4,67$  minutos, respectivamente, que pode ser

referente à mefloquina, mas não podemos afirmar devido à grande instabilidade da linha de base. Em 230 nm e 254 nm, comprimentos de onda de maior absorção do BENZ e do 3,5-DNB, respectivamente, não foi visualizado nenhum pico.

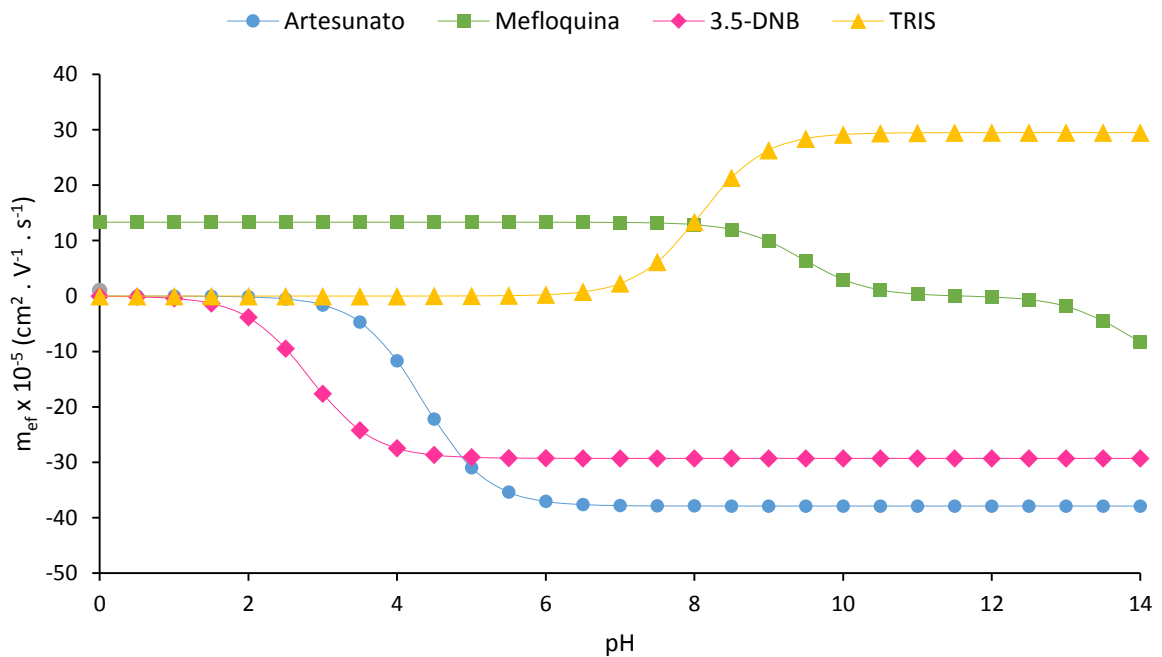
Figura 164: Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da mistura de fármacos na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, em eletrólitos constituídos por 30 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato e 10 mmol L<sup>-1</sup> de BENZ (E) e por 30 mmol L<sup>-1</sup> de tampão acetato com 5 mmol L<sup>-1</sup> de 3,5-DNB (F), ambos em 220 nm.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75 µm d.i., 375 µm d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +25 kV; temperatura de 25 °C.  
Fonte: Elaborada pela autora.

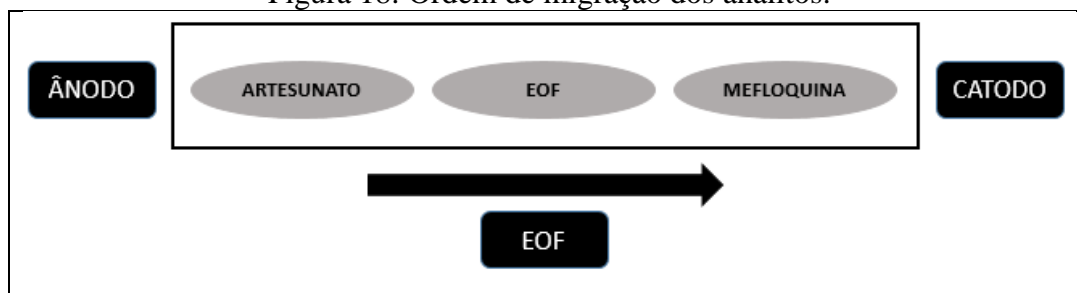
O eletrólito III, contendo o tampão Tris/3,5-DNB na concentração de 20/10 mmol L<sup>-1</sup>, mostrou resultados satisfatórios que podem ser justificados pelas curvas de mobilidade dos analitos, do 3,5-DNB e do Tris, mostradas na Figura 17. No sistema Tris/3,5-DNB, a base Tris é protonada e o 3,5-DNB é desprotonado, formando o cátion Tris-H<sup>+</sup> e ânion 3,5-dinitrobenzoato, ou seja, Tris se comporta como cátion e o 3,5-DNB se comporta como ânion. Analisando as curvas de mobilidade, em pH 8,0, a mobilidade do Tris é próxima à da mefloquina, o que confirma seu comportamento catiônico. Com isso, tende a se deslocar pelo capilar em direção ao eletrodo de carga negativa e migra com velocidade maior do que a do EOF ( $\mu_{obs} > \mu_{EOF}$ ). Da mesma forma, neste pH a mobilidade do 3,5-DNB é próxima à do artesunato, o que também confirma seu comportamento aniônico e com isso, tende a se deslocar para o eletrodo de carga positiva, mas é arrastado pelo EOF para o eletrodo de carga negativa, migrando com uma velocidade menor que a do EOF ( $\mu_{obs} < \mu_{EOF}$ ). Esse aspecto caracteriza a detecção direta para a mefloquina e indireta para o artesunato e as diferenças nas velocidades eletroforéticas indicam a ordem de migração, que pode ser observada na Figura 18.

Figura 17: Curvas de mobilidade efetiva para o artesunato, a mefloquina, o 3,5-DNB e o Tris.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18: Ordem de migração dos analitos.



Elaborada pela autora.

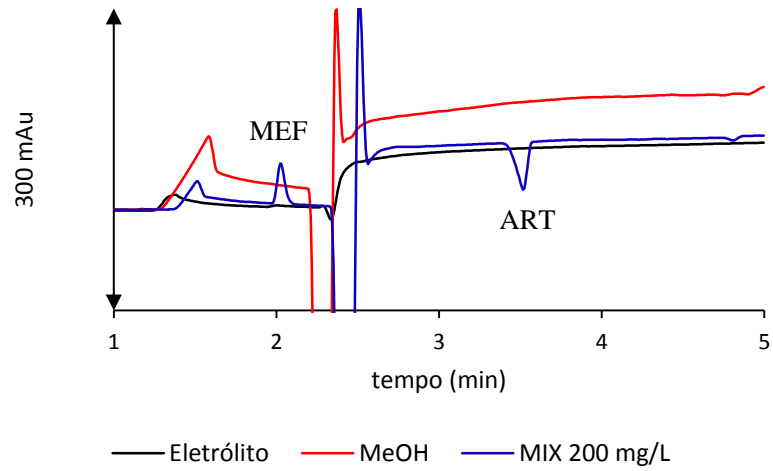
As análises foram monitoradas na faixa de 210 a 220 nm e em 254 nm. Observando os eletroferogramas em cada comprimento de onda, decidiu-se avaliar apenas três devido aos maiores valores de área dos picos: 214, 220 (comprimento de onda de maior absorção da mefloquina) e em 254 nm (comprimento de onda de maior absorção do cromóforo). As demais condições foram: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 75  $\mu\text{m}$  d.i., 375  $\mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica de 30 mbar por 10,0 s; voltagem positiva de 25 kV; temperatura do capilar mantida em 25 °C.

Na Figura 19 pode-se observar os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da separação dos componentes da mistura de fármacos (linha azul) nos três comprimentos de onda, em 214 nm (G), 220 nm (H) e 254 nm (I). Os picos em azul em 2,04 e 3,51 minutos são referentes à mefloquina e ao artesunato, respectivamente. Esse fato corrobora a ordem de migração explicada anteriormente na Figura 18.

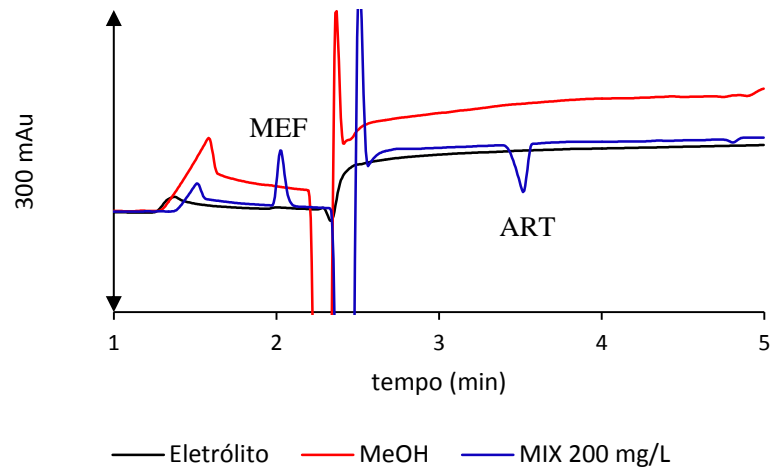
Em 254 nm (I), como já era esperado, foi identificado apenas o pico para o artesunato. Em 214 (G) e 220 nm (H) foi possível identificar os picos para ambos os analitos. Após verificar as áreas dos picos referentes aos analitos, concluiu-se que em 214 nm (G) o sinal do artesunato tem maior intensidade e por isso, este comprimento de onda foi escolhido para a detecção dos analitos. Com isso, temos a vantagem da utilização de um único comprimento de onda para a determinação simultânea dos fármacos, que pode ser útil quando não se tem um equipamento que permita o monitoramento de mais de um comprimento de onda.

Figura 19: Eletroferogramas da mistura de fármacos, na concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , em eletrólito constituído por  $20/10 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão TRIS/3,5-DNB, em 214 nm (G), 220 nm (H) e 254 nm (I).

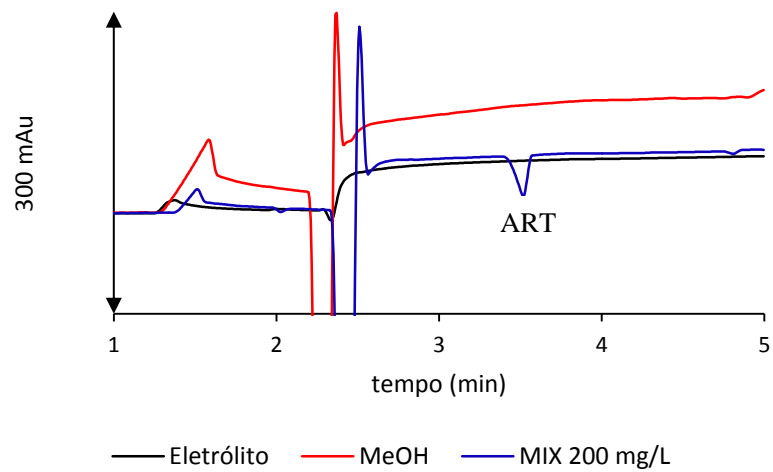
**G**



**H**



**I**

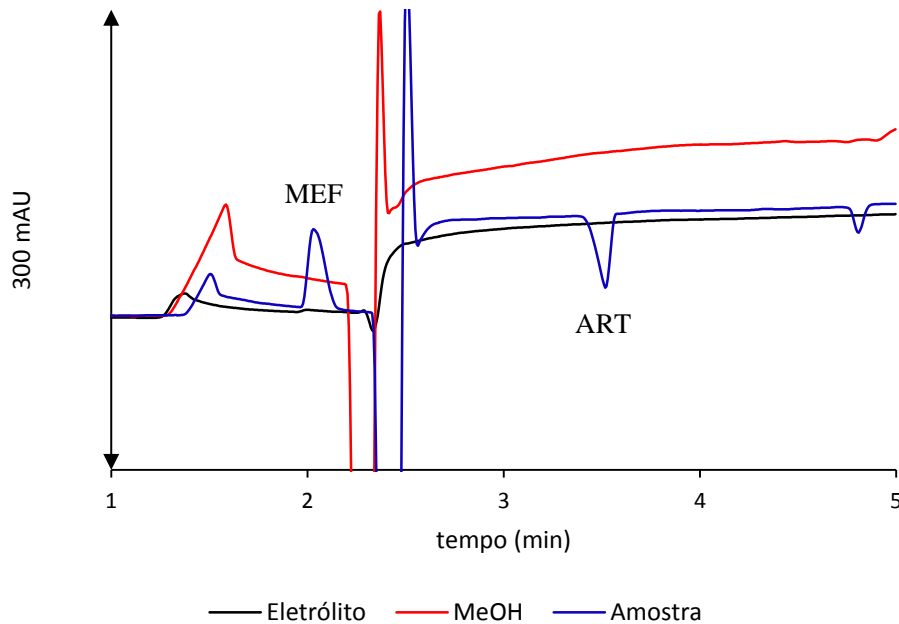


Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo),  $75 \mu\text{m}$  d.i.,  $375 \mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +25 kV; temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . MEF: mefloquina; ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar o comportamento dos analitos na amostra, foi realizado um teste qualitativo, utilizando apenas um comprimido de DFC. A amostra foi preparada, conforme item 3.2 e analisada sob condições idênticas as da Figura 19 (G). Os eletroferogramas do eletrólito (linha preta), do metanol (linha vermelha) e da amostra (linha azul) podem ser observados na Figura 20.

Figura 20: Eletroferogramas do eletrólito, do metanol e da amostra de 2-DFC, nas concentrações teóricas de  $212 \text{ mg L}^{-1}$  para o artesunato e de  $424 \text{ mg L}^{-1}$  para a mefloquina, em eletrólito constituído por  $20/10 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão TRIS/3,5-DNB, em  $214 \text{ nm}$ .



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo),  $75 \mu\text{m}$  d.i.,  $375 \mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +25 kV; temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . MEF: mefloquina, ART: artesunato.  
Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil de separação dos fármacos na amostra é bastante semelhante ao da mistura de fármacos, Figura 19 (G). Entretanto, foi observado que a janela de detecção entre o pico da mefloquina e sinal do EOF estava muito estreita, e isso poderia comprometer a análise. Neste contexto, decidiu-se por realizar um planejamento de experimentos a fim de encontrar qual a melhor condição de análise.

O estudo da otimização das condições de análise foi feito a partir de um planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  e foi realizado na amostra por apresentar um bom perfil de separação dos fármacos. Foram selecionados como fatores do planejamento a voltagem, a temperatura e a concentração do tampão Tris/3,5-DNB, com três níveis para cada fator, que podem ser vistos

na Tabela 9. Também foi alterado o diâmetro interno do capilar, que passou de 75  $\mu\text{m}$  para 50  $\mu\text{m}$ , para melhorar a seletividade e maximizar o efeito de dissipação do calor gerado pelo efeito Joule. Os demais parâmetros foram mantidos constantes: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo); injeção hidrodinâmica de 30 mbar por 10,0 s; detecção em 214 nm. A matriz de planejamento é mostrada na Tabela 10.

Tabela 9: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  para o estudo de otimização das condições eletroforéticas.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
$X_1$ – Voltagem (kV)	25	27,5	30
$X_2$ – Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	22,5	25
$X_3$ – Concentração do tampão ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	20/10	25/12,5	30/15

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10: Matriz de planejamento Box-Behnken  $3^3$  para o estudo de otimização das condições eletroforéticas.

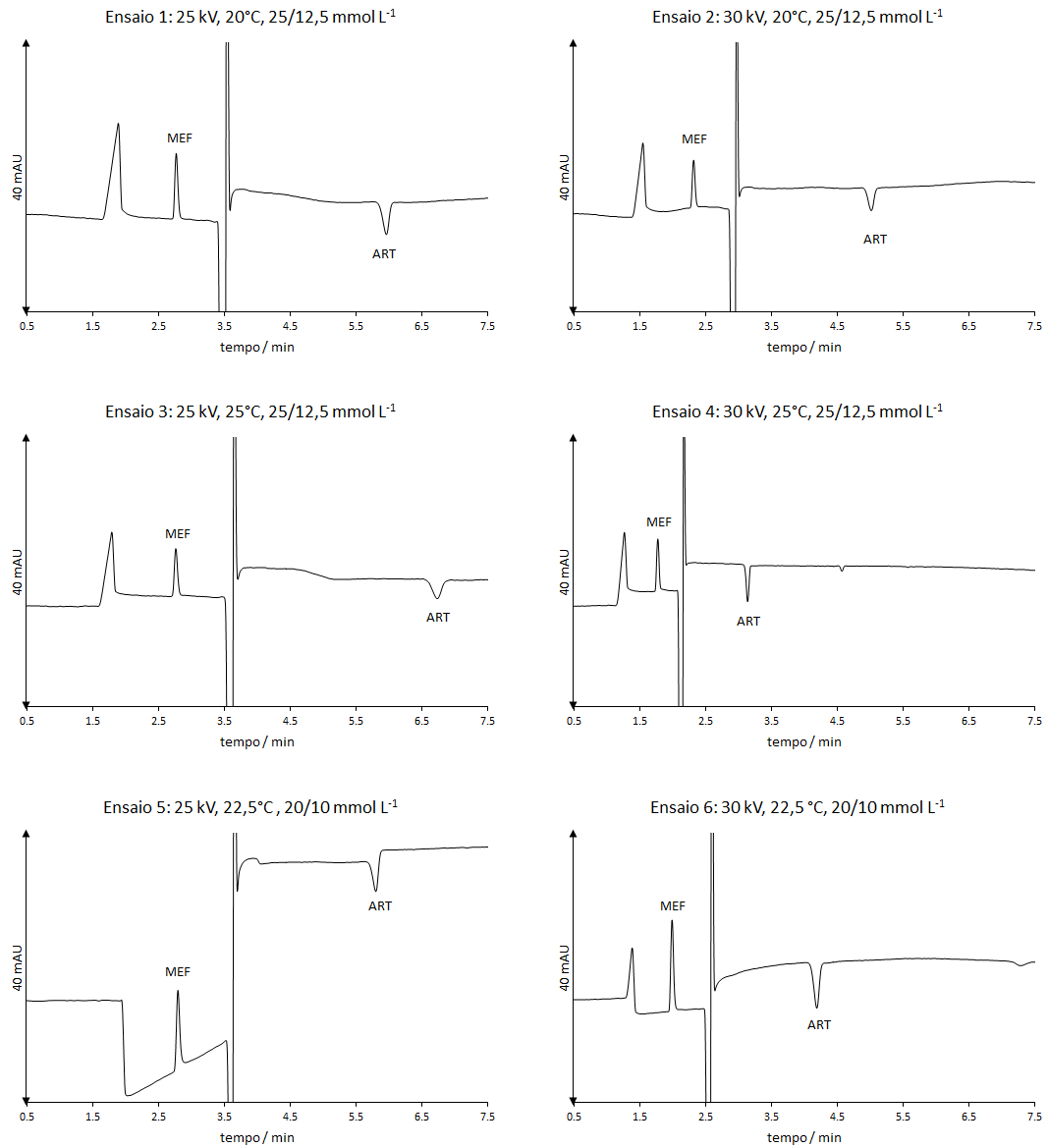
Ensaio	Voltagem (kV)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Concentração do tampão ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fonte: Elaborada pela autora.



Nas Figuras 21, 22 e 23 podemos observar todos os eletroferogramas referentes ao planejamento, incluindo a triplicata no ponto central.

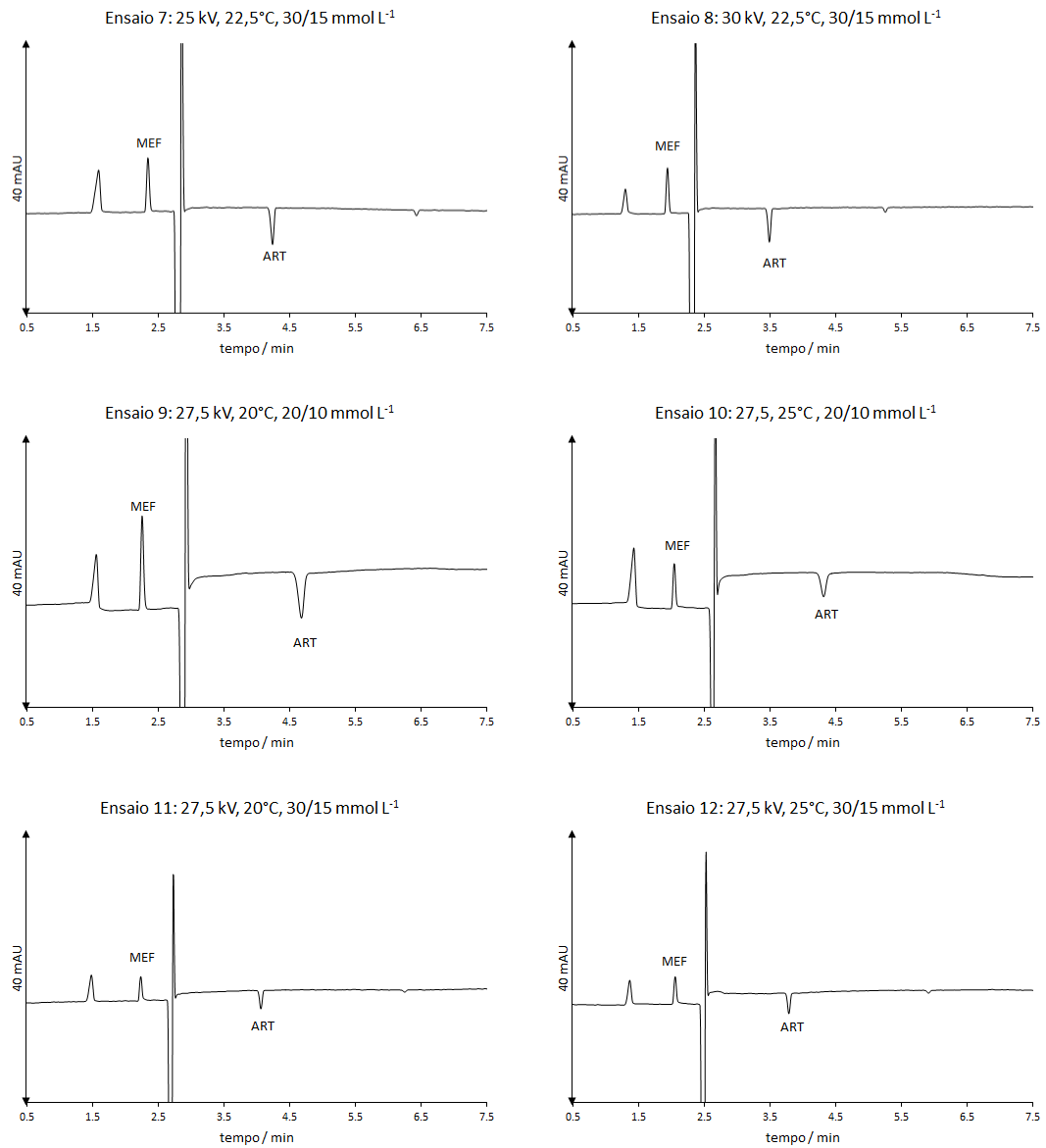
Figura 21: Eletroferogramas dos ensaios de 1 a 6, conforme Tabela 10.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 50 µm d.i., 375 µm d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; detecção em 214 nm. MEF: mefloquina, ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

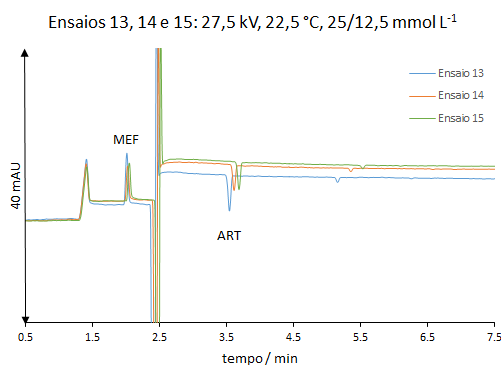
Figura 22: Eletroferogramas dos ensaios de 7 a 12, conforme Tabela 10.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 50  $\mu\text{m}$  d.i., 375  $\mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; detecção em 214 nm. MEF: mefloquina, ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23: Eletroferogramas dos ensaios de 13 a 15, conforme Tabela 10.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 50  $\mu\text{m}$  d.i., 375  $\mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; detecção em 214 nm. MEF: mefloquina, ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

A resposta do planejamento foi uma avaliação qualitativa do perfil de separação dos analitos nas Figuras 21, 22 e 23. Em todos os ensaios, os analitos foram separados, sendo que em alguns, a janela de detecção entre o pico da mefloquina e sinal do EOF permaneceu muito estreita. Em outros ensaios, têm-se a janela de detecção maior, porém a intensidade do sinal é mais baixa, o que também não é desejado. Outro fator que também influenciou na escolha da melhor condição é a estabilidade da linha base. Neste contexto, os ensaios com concentração 30/15 mmol L<sup>-1</sup> do eletrólito são os que possuem melhor simetria dos picos e maior estabilidade da linha base, e dos quatro ensaios que foram realizados nesta condição (7, 8, 11 e 12), 7 e 8 foram os que apresentaram resultados mais satisfatórios. Na Tabela 11 estão descritas as condições dos ensaios 7 e 8.

Tabela 11: Voltagem, temperatura e concentração do tampão dos ensaios 7 e 8.

Ensaio	Voltagem (kV)	Temperatura (°C)	Concentração do tampão (mmol L <sup>-1</sup> )
7	25	22,5	30/15
8	30	22,5	30/15

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o objetivo de definir qual a condição mais adequada para obter um melhor perfil de separação dos fármacos, foi realizado um estudo de repetibilidade dos ensaios 7 e 8, através de dez injeções consecutivas da mistura de padrões dos fármacos. Na Tabela 12 são mostrados os valores de média e RSD, considerando as áreas dos picos dos analitos, e a Figura 24 apresenta os eletroferogramas dos ensaios.

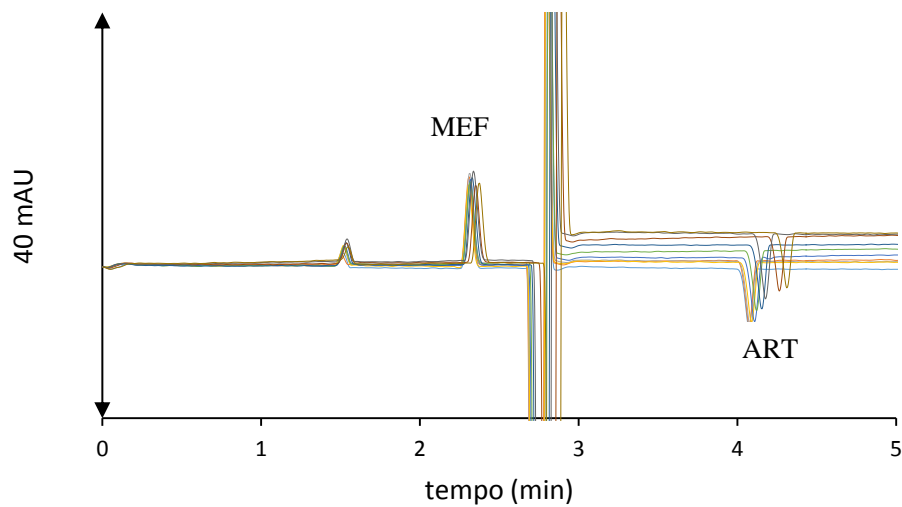
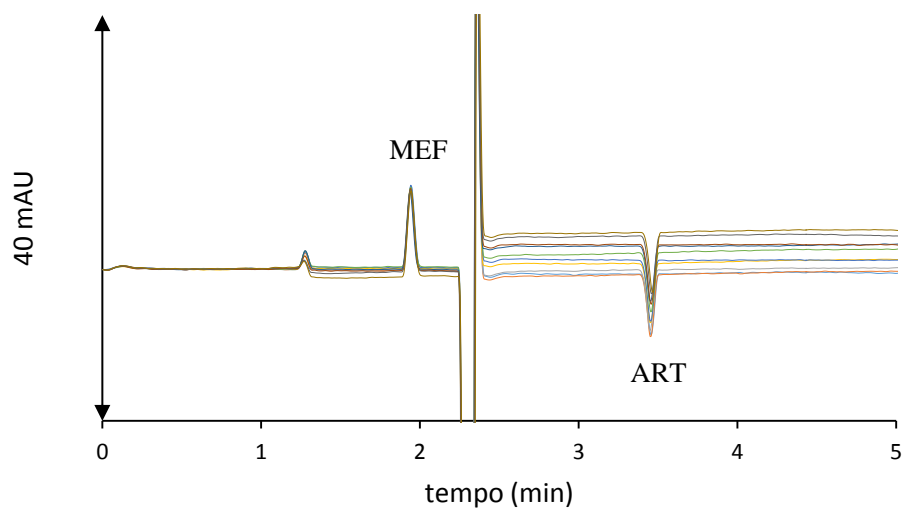
Tabela 121: Estudo de repetibilidade dos ensaios 7 e 8.

	Ensaio 7		Ensaio 8	
	Mefloquina	Artesunato	Mefloquina	Artesunato
Média*	26,375	19,332	23,917	17,770
RSD (%)*	8,767	9,479	4,096	5,984

\*(n = 10)

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24: Estudo de repetibilidade dos ensaios 7 e 8.

Ensaio 7: 25 kV, 22,5°C, 30/15 mmol L<sup>-1</sup>Ensaio 8: 30 kV, 22,5°C, 30/15 mmol L<sup>-1</sup>

Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 50 µm d.i., 375 µm d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; detecção em 214 nm. Demais condições na Tabela 12. MEF: mefloquina, ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela Tabela 12 pode-se observar que o ensaio 8 apresentou menor valor de RSD do que o ensaio 7 para ambos os fármacos, fato que é ilustrado pelos eletroferogramas das dez injeções, Figura 24, indicando uma menor variabilidade nas injeções. Neste contexto, o ensaio 8 foi escolhido como condição adequada para a análise dos fármacos.

O método desenvolvido e otimizado possui as seguintes características: capilar de sílica fundida revestido externamente com poliamida com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm efetivo) e 50  $\mu\text{m}$  d.i. x 375  $\mu\text{m}$  d.e.; temperatura do capilar mantida em 22,5 °C, voltagem positiva de 30 kV; injeção hidrodinâmica de 30 mbar por 10,0 s para as amostras e de 30 mbar por 5,0 s para o eletrólito; eletrólito constituído por tampão Tris/3,5-DNB na concentração de 30/15  $\text{mmol L}^{-1}$ ; detecção em 214 nm; tempo total de análise de 6 minutos. O condicionamento entre corridas foi estabelecido em *flush* de solução de NaOH 1  $\text{mol L}^{-1}$  por 1 minuto, *flush* de MeOH por 1 minuto, *flush* de água deionizada por 1 minuto e *flush* de solução de eletrólito por 3 minutos.

#### 4.4 VALIDAÇÃO

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados por meio de ensaios com as soluções padrões e amostra.

##### 4.4.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de curvas analíticas com cinco níveis de concentração, na faixa de 70 a 130%. A partir de soluções estoques de artesunato e cloridrato de mefloquina nas concentrações de 500 e 1000  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente, foram feitas as diluições necessárias para obter as concentrações descritas na Tabela 13, cada nível em triplicata. As soluções foram injetadas e analisadas no equipamento de CE de forma aleatória.

Tabela 13: Níveis de concentração para o artesunato e a mefloquina.

Faixa de concentração	Artesunato (mg L <sup>-1</sup> )	Mefloquina (mg L <sup>-1</sup> )
70%	140,00	280,90
85%	170,00	340,71
100%	200,00	400,84
115%	230,00	460,97
130%	260,00	521,09

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 14 são apresentados os valores das áreas dos picos de cada réplica e também os valores de RSD para cada fármaco. Observou-se que para o artesunato foram obtidos valores de RSD menores do que 5% para todos os níveis, enquanto que para a mefloquina tem-se RSD maior que 5% apenas para o quarto nível.

Tabela 14: Valores de área e RSD (%) para obtenção das curvas analíticas do artesunato e da mefloquina.

Nível	Mefloquina		Artesunato	
	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)
70%	47,47		26.62	
	44,68	3,17	26.66	3.88
	46,87		24.82	
85%	59,22		31.15	
	59,25	1,74	32.63	2.50
	57,46		31.38	
100%	67,31		39.46	
	64,27	3,20	39.79	1.07
	68,38		38.95	
115%	84,72		41.79	
	75,57	5,98	41.04	1.99
	82,91		42.71	
130%	97,31		51.32	
	96,31	1,03	50.46	3.14
	95,47		48.27	

Fonte: Elaborada pela autora.

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para obtenção das curvas analíticas para cada fármaco, além dos valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, conforme descrito na Tabela 15. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos para cada fármaco são próximos de 1,0, indicando que o ajuste feito pelo modelo é satisfatório.

Tabela 152: Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação para as curvas analíticas.

	Equação da curva	<i>r</i>
Mefloquina	$y = 0,2041x - 11,9830$	0,987
Artesunato	$y = 0,1935x - 0,8863$	0,985

Fonte: Elaborada pela autora.

O modelo de regressão proposto só pode ser utilizado se sua linearidade for verificada e se não apresentar evidências de falta de ajuste. Logo, apenas a avaliação do coeficiente de correlação não é suficiente para a obter a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada, tornando necessário realizar testes de significância da regressão e de falta de ajuste, Equações 18 e 19 (PIMENTEL & NETO, 1996). Esses testes foram feitos pela da análise de variância, conforme os cálculos mostrados na Tabela 16.

$$F_{cal} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad (18)$$

$$F_{cal} = \frac{MQ_{reg}}{MQ_r} \quad (19)$$

Tabela 16: Análise de variância para o ajuste do modelo através do método dos mínimos quadrados.

Fonte	Soma Quadrática (SQ)	G. L.	Média Quadrática (MQ)
Regressão (reg)	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p - 1	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{(p - 1)}$
Resíduos (res)	$SQ_{res} = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n - p	$MQ_{res} = \frac{SQ_r}{(n - p)}$
Falta de ajuste (faj)	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m - p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{(m - p)}$
Erro Puro (ep)	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	n - m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{(n - m)}$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_m)^2$	n - 1	

$n_i$  = número de repetições no nível  $i$  ( $n_i = 3$ );  $m$  = número de níveis distintos da variável independente ( $m = 5$ );  $n = \sum n_i$  = número total de medidas ( $n = 15$ );  $p$  = número de parâmetros do modelo ( $p = 2$ ); o índice  $i$  indica o nível da variável independente e o índice  $j$  indica as medidas repetidas da variável dependente em um dado nível de  $x$ ; o segundo somatório das expressões  $SQ_{res}$ ,  $SQ_{ep}$  e  $SQ_t$  vai de  $j = 1$  até  $j = n_i$  e os outros somatórios vão de  $i = 1$  até  $i = m$ ;  $y_m$  é a média de todos os valores de  $y$ ;  $y_{im}$  é a média das determinações repetidas no nível  $i$ .

Fonte: PIMENTEL & NETO, 1996.

Na avaliação da significância da regressão, o valor de  $F_{cal}$  deve ser pelo menos cinco vezes maior do que o  $F_{tab}$  para que exista uma relação linear entre as variáveis. Já para o teste de falta de ajuste, o valor de  $F_{cal}$  deve ser menor do que o  $F_{tab}$  para que não haja evidências de falta de ajuste do modelo (PIMENTEL & NETO, 1996). Na Tabela 17 são mostrados os resultados estatísticos para os testes de significância da regressão e falta de ajuste.

Além disso, os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência também foram verificados. O pressuposto da independência foi satisfeito devido às soluções dos padrões terem sido injetadas no equipamento de CE de forma aleatória. Os testes de Shapiro-Wilk e de Levene foram utilizados para avaliar a normalidade e a homocedasticidade, respectivamente, sendo que, para ambos os testes, o p-valor deve ser maior que 0,05. Na Tabela 17 também podem ser vistos os resultados estatísticos para a verificação dos pressupostos. Estes testes foram realizados no *software* MiniTab14.



Tabela 17: Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado.

		Artesunato	Mefloquina
Falta de ajuste	$F_{cal}$	0,57	2,71
	$F_{tab}$	3,71	3,71
Significância da regressão	$F_{cal}$	277,17	501,01
	$F_{tab}$	4,67	4,67
Normalidade	p-valor	> 0,100	> 0,100
Homocedasticidade	p-valor	0,823	0,560

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando os resultados estatísticos da Tabela 17, não há falta de ajuste nos modelos à 95 % de confiança, uma vez que o valores de  $F_{cal}$  são menores do que o  $F_{tab}$ , para ambos os fármacos. Os modelos também apresentaram uma relação linear, ou seja, regressões significativas, pois os valores de  $F_{cal}$  são pelo menos cinco vezes maiores do que o  $F_{tab}$ , para ambos os fármacos. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade também foram satisfeitos pois os p-valores dos modelos foram maiores do que 0,05, indicando que os dados seguem uma distribuição normal e são homocedásticos.

Assim, o modelo de regressão implementado pode ser utilizado para a quantificação das amostras de fármacos nas formulações farmacêuticas 2-DFC.

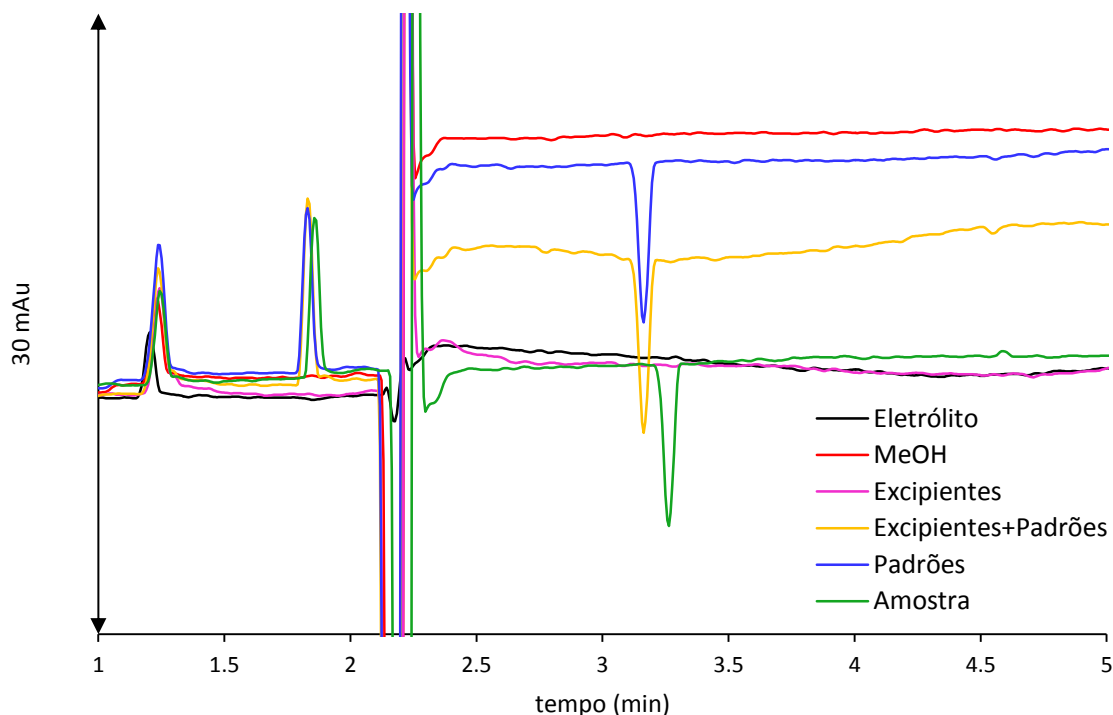
#### 4.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando a matriz sem os fármacos (excipientes) com a matriz adicionada dos fármacos (excipientes + fármacos) e com a amostra. Na Figura 25 são mostrados os eletroferogramas para a avaliação da seletividade. Foram realizadas injeções do eletrólito, metanol, excipientes, excipientes + padrões dos fármacos, padrões dos fármacos e, por fim, amostra. Os padrões foram injetados nas concentrações de 140,00 e 280,90 mg L<sup>-1</sup> de artesunato e de mefloquina, respectivamente, e a amostra também foi preparada nas mesmas concentrações.

Observando o eletroferograma do eletrólito (linha preta), vê-se dois picos em 1,21 e 2,18 minutos que são característicos do eletrólito. Nos eletroferogramas do metanol (linha vermelha) e dos excipientes (linha e rosa), os picos existentes são os referentes ao eletrólito. Já nos eletroferogramas dos excipientes + padrões, padrões e amostra (linhas amarela, azul e verde, respectivamente) além dos picos referentes ao eletrólito, tem-se os picos da mefloquina em

1,84 minutos e do artesunato, em 3,20 minutos, conforme já identificados na Figura 19. Assim, pode-se concluir que o método é seletivo pois não há interferência dos excipientes na determinação dos fármacos.

Figura 25: Avaliação da seletividade do método desenvolvido e otimizado.



Condições de análise: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), 50  $\mu\text{m}$  d.i., 375  $\mu\text{m}$  d.e.; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s; voltagem de +22,5 kV; temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ ; eletrólito 30/15  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão TRIS/3,5-DNB; detecção em 214 nm. MEF: mefloquina, ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4.3 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada pelo RSD de medidas entre corrida sucessivas da amostra, considerando-se a área dos picos dos analitos, conforme Tabela 18. A precisão intermediária também foi avaliada pelo RSD de medidas entre corridas sucessivas da amostra, em termos da área dos analitos, em dois dias distintos, conforme Tabela 18. As amostras foram preparadas nas concentrações de 200,00 e 400,84  $\text{mg L}^{-1}$  de artesunato e mefloquina, respectivamente.

Tabela 18: Valores de RSD para a repetibilidade e precisão intermediária.

	RSD (%) <sup>*</sup>	RSD (%) <sup>**</sup>
	Repetibilidade	Precisão intermediária
Mefloquina	1,77	2,10
Artesunato	1,92	2,79

<sup>\*</sup>(n = 6); <sup>\*\*</sup>(n = 12)

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de RSD para as áreas dos picos dos analitos na amostra foram menores do que 5% tanto para a repetibilidade, quanto para a precisão intermediária, indicando que o método apresenta boa precisão.

#### 4.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, com fortificação das amostras com soluções dos padrões, em três níveis de concentração em triplicata. Os níveis de concentração escolhidos foram 70, 100 e 130% da curva analítica, ou seja, o primeiro nível de recuperação corresponde às concentrações de 140,00 e 280,90 mg L<sup>-1</sup> para o artesunato e mefloquina, o segundo nível corresponde a 200,00 e 400,84 mg L<sup>-1</sup> de artesunato e mefloquina, e o terceiro nível à 260,00 e 521,09 mg L<sup>-1</sup> de artesunato e mefloquina, respectivamente. A recuperação foi determinada pela Equação 10. A Tabela 19 apresenta as porcentagens de recuperação médias determinadas para os fármacos.

Tabela 19: Porcentagem de recuperação média e desvio padrão para o artesunato e mefloquina.

Mefloquina		Artesunato	
Concentração	Recuperação	Concentração	Recuperação
(mg L <sup>-1</sup> )	(%)	(mg L <sup>-1</sup> )	(%)
280,90	104,53 ± 2,76	140,00	100,25 ± 1,99
400,84	98,75 ± 4,00	200,00	98,13 ± 1,62
521,09	106,77 ± 1,18	260,00	101,41 ± 2,43

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando a Tabela 19 vê-se que os resultados foram satisfatórios e estão dentro da faixa aceitável para recuperação, 90 a 110% (INMETRO, 2018). A recuperação para o artesunato variou de 98,13 a 101,41 %, enquanto que para a mefloquina a recuperação foi de 98,75 a 106,77 %.

#### 4.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram avaliados pela relação sinal/ruído e calculados pelas Equações 11 e 12. As amostras foram preparadas em seis réplicas autênticas e na Tabela 20 são mostrados os valores médios de LD e LQ para o artesunato e mefloquina. Todos os valores de LD e LQ para ambos os fármacos foram menores do que as concentrações do primeiro ponto das curvas, 140,00 e 280,90 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, mostrando a sensibilidade do método.

Tabela 20: Valores de LD e LQ.

	LD (mg L <sup>-1</sup> )*	LQ (mg L <sup>-1</sup> )*
Mefloquina	9,58	31,95
Artesunato	7,85	26,17

\*(n = 6)

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.5 TRABALHOS FUTUROS

O método analítico apresentado nesta dissertação consiste na determinação simultânea de artesunato e mefloquina em formulações farmacêuticas de 2-DFC. Neste contexto, as sugestões para os próximos trabalhos são:

- A) Aplicação do método analítico para a quantificação dos fármacos nas amostras de 2-DFC e verificação dos resultados frente aos limites estabelecidos pela ANVISA;
- B) Realização de experimentos com a utilização dos métodos descritos nos compêndios farmacopeicos para comparação com o método analítico desenvolvido;
- C) Realização de experimentos com a utilização do método descrito por NOGUEIRA *et al.* (2013), que realiza a determinação simultânea dos fármacos na mesma associação 2-DFC por CLAE, para comparação com o método analítico desenvolvido.

## 5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método inédito para a determinação simultânea de artesunato e mefloquina em formulações farmacêuticas de dose fixa combinada por eletroforese capilar de zona com detecção direta e indireta por UV. A curva de mobilidade efetiva obtida foi útil para selecionar a melhor faixa de pH para a separação, e com isso, foi possível realizar testes com eletrólitos de diferentes composições. Devido à baixa absorvidade molar do artesunato, o método envolve o uso de um agente cromóforo no eletrólito para a sua detecção indireta, sendo utilizado o ácido 3,5-dinitrobenzóico.

O estudo das condições experimentais para a separação dos analitos mostrou que o perfil de separação na mistura de padrões é idêntico ao da amostra. Para definir qual a melhor condição de análise, um planejamento de experimentos variando a voltagem, a temperatura e a concentração do tampão foi realizado. Dois ensaios mostraram condições promissoras e, por de um estudo de repetibilidade, foi definido qual apresentava ser o mais adequado para as análises dos fármacos.

As condições do método otimizado são: temperatura do capilar mantida em 22,5 °C; injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10,0 s, seguida da injeção do eletrólito 30 mbar por 10,0 s; voltagem positiva de 30 kV; capilar de sílica fundida revestido externamente com poliamida de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo), com 50 µm d.i. x 375 µm d.e; detecção em 214 nm e composição do eletrólito de 30/15 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Tris/3,5-DNB em pH 8,0.

A validação foi realizada avaliando-se os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Todos os resultados se mostraram satisfatórios, dentro dos limites preconizados pela Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA.

Como sugestão para os próximos trabalhos estão a aplicação do método analítico para a quantificação dos fármacos nas amostras de 2-DFC, a realização de experimentos com a utilização dos métodos descritos nas farmacopeias e por NOGUEIRA *et al.* (2013) para comparação com o método analítico desenvolvido.

## REFERÊNCIAS

- AMIN, N. C.; BLANCHIN, M. D.; AKE, M.; MONTELS, J.; FABRE, H. Capillary electrophoresis for the assay of fixed-dose combination tablets of artesunate and amodiaquine. **Malaria Journal**, 2012.
- BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry)**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, 6ª ed. Brasília, DF, 2019b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z. **Malária: Boletim epidemiológico da Malária nas regiões amazônica e extra-amazônica**. Brasil, 2019a. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>>. Acesso em 29 ago 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de julho de 2017b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância em Saúde**, vol. 3, 1ª ed. Brasília, 2017a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z. **Malária: Mapa de risco por município de infecção em 2018**. Brasil, 2018. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>>. Acesso em 29 ago 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 25, 2015.
- BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Agência Fiocruz de Notícias. **Doenças Negligenciadas**. Brasil, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em 23 jun 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil** (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 1ª ed. Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária** (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2ª ed. Brasília, 2009.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Rev. De Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CAS, Chemical Abstracts Service, Scifinder Artesunate & Mefloquine, **American Chemical Society**, Columbus, Ohio, USA, 2018.

COLOMBARA, R. **Desenvolvimento de metodologia para análise de ânions por eletroforese capilar aplicada a emissão veicular**. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

D'HULST, A.; AUGUSTIJNS, P.; ARENS, S. VAN PARIJS, L.; COLSON, S.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Determination of Artesunate by Capillary Electrophoresis with Low UV Detection and Possible Applications to Analogues. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, p. 276-281, 1996.

FARIA, A. F. **Desenvolvimento, otimização e validação de metodologias por eletroforese capilar para análise de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389 – 396, 2008.

FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., FERREIRA, H. S., MATOS, G. D., DAVID, J. M., BRANDÃO, G. C., DA SILVA, E. G. P., PORTUGAL, L. A., DOS REIS, P. S., SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.

GABRIELS, M., JIMIDAR, M., PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Detection and separation of artesunate and artelinic acid with capillary zone electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 193-198, 1999.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

INMETRO. DOQ-CGCRE-08: **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**. Inmetro. Rio de Janeiro, Julho 2018.

LAMALLE, C.; SERVAIS, A. C.; FRADI, I.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Micellar electrokinetic chromatography systems for the separation of mixtures of charged and uncharged compounds. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 1933-1939, 2012.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NOGUEIRA, F. H. A. **Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para a Quantificação dos Antimaláricos Artesunato e Mefloquina**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

NOGUEIRA, F. H. A.; REIS, N. F. A.; CHELLINI, P. R.; CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of artesunate and mefloquine hydrochloride in fixed-dose combination tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 837-843, 2013.

OLIVEIRA, M. A. L.; SOARES, D. C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. C.; VAZ, F. A. S. Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Stream by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 484-490, 2012.

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

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

SATO, R. T. **Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livre, em óleos vegetais, por eletroforese capilar**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

SPUDEIT, D. A.; GONÇALVES, S.; BRETANHA, L. C.; CLAUMANN, C. A.; MACHADO, R. A. F.; MICKE, G. A. A Systematic Procedure to Develop a Capillary Electrophoresis Method Using a Minimal Experimental Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 11, p. 1974-1979, 2016.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36<sup>a</sup> ed. London: Pharmaceutical Press, 2009, p. 594-615.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, 1996.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 8.ed. Geneva: World Health Organization, 2018.

THE MERCK Index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 15. ed. Merck Co., 2013, p.5873.

THE UNITED States Pharmacopeia. **USP 36**. 36 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

THOMPSON M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Diseases**. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em 23 jun 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Expert Committee on Malaria. **World Malaria Report 2018**. Geneva, 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Treatment of Malaria**, 3<sup>a</sup> ed. Geneva, 2015.



WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Expert Committee on Malaria. **World Malaria Report 2014**. Geneva, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Expert Committee on Malaria. **Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010**. Geneva, 2010.