

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

Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza

Desenvolvimento e validação de métodos por eletroforese capilar para a quantificação de primaquina em comprimidos e visando a determinação de artemeter e lumefantrina em dose fixa combinada

Juiz de Fora

2025

Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza

Desenvolvimento e validação de métodos por eletroforese capilar para a quantificação de primaquina em comprimidos e visando a determinação de artemeter e lumefantrina em dose fixa combinada

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Chellini

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cordeiro Queiroz de Souza, Jéssica.

Desenvolvimento e validação de métodos por eletroforese capilar para a quantificação de primaquina em comprimidos e visando a determinação de artemeter e lumefantrina em dose fixa combinada / Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza. -- 2025.

134 p.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Paula Rocha Chellini

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Primaquina. 2. Artemeter. 3. Lumefantrina. 4. Eletroforese Capilar de Zona. 5. Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão .
I. Leal de Oliveira, Marcone Augusto , orient. II. Rocha Chellini, Paula, coorient. III. Título.

Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza

Desenvolvimento e validação de métodos por eletroforese capilar para a quantificação de primaquina em comprimidos e visando a determinação de artemeter e lumefantrina em dose fixa combinada

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 28 de janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira – Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Paula Rocha Chellini – Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Tarso Ledur Kist

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato

Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Juiz de Fora, 24/01/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Tarso Benigno Ledur Kist, Usuário Externo**, em 28/01/2025, às 19:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudimir Lucio do Lago, Usuário Externo**, em 29/01/2025, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Henrique Andrade Nogueira, Usuário Externo**, em 29/01/2025, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Chellini, Professor(a)**, em 29/01/2025, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Valéria Colnaghi Simionato, Usuário Externo**, em 30/01/2025, às 07:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 30/01/2025, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2210466** e o código CRC **E2B84883**.

Dedico esta tese aos meus pais, Carlos Henrique e Flávia. Obrigada pela dedicação, amor e apoio durante minha jornada.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Carlos Henrique e Flávia, pelo amor, por todo apoio e compreensão, por acreditarem em mim, por me incentivarem a seguir e realizar meus sonhos, por comemorarem cada conquista minha e me ajudarem a superar todas as dificuldades pelo caminho.

À minha irmã, Gabrielle, pelo amor, apoio, parceria, amizade e inspiração, pelos nossos momentos de diversão e aprendizado uma com a outra.

Ao meu marido Eduardo, pelo amor, paciência e apoio durante todos os momentos de conquistas e de dificuldades. Por me aguentar falar de eletroforese capilar, da ANVISA e de artigos. Por me incentivar a continuar realizando meus objetivos pessoais e profissionais.

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

Ao meu orientador Marcone, por acreditar em mim, pela paciência, apoio e amizade, pelas críticas que me fizeram ser uma pesquisadora melhor. Pelos 10 anos compartilhando conhecimentos e conselhos no GQAQ, desde a iniciação científica ao doutorado.

À minha coorientadora Paula, pelo carinho, apoio, paciência e amizade. Pelos conhecimentos e conselhos trocados ao longo desses 7 anos de parceria durante o mestrado e doutorado.

Aos membros do Grupo de Química Analítica e Quimiometria pela convivência diária no laboratório, pela amizade ao longo de toda minha vida acadêmica. Em especial, as amigas Maria Patrícia, Olívia e Patrícia, pela amizade, parceria, pela nossa troca diária de conhecimentos, por nossas confraternizações fora do laboratório, por serem mais que colegas de trabalho, por estarem comigo nos momentos de comemorações e nas dificuldades encontradas pelo caminho.

À Brenda e Renatinha, por terem me acolhido durante a graduação, vocês são pessoas importantes na minha jornada acadêmica. À Eduarda, pela nossa breve experiência como orientadora e orientanda de iniciação científica, pela amizade e troca de conhecimentos. A todos

que ainda estão pelo GQAQ, Luiz Henrique, Bruna, Arthur, Raphaela, e aqueles que passaram por lá e que tive a oportunidade de conviver ao longo desses meus 10 anos no grupo.

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

Aos professores Dr. Dosil Pereira de Jesus, Dra. Isabela da Costa César e Dra. Adriana Ferreira Faria pelas contribuições no exame de qualificação, e aos professores Dr. Claudimir Lucio do Lago, Dr. Tarso Ledur Kist, Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato e Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira pelas contribuições na defesa da tese.

Ao Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) pela troca de conhecimentos e conselhos, pela doação dos medicamentos e de matérias-primas dos fármacos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela infraestrutura.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e, juntamente com a UFJF, CNPq e a FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.” (Robert Collier)

RESUMO

A malária é uma doença tropical negligenciada e infecciosa causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, sendo endêmica nos países com populações mais pobres e vulneráveis, representando grave problema de saúde pública no mundo. Atualmente, para a malária não complicada causada pelo *P. falciparum* é recomendada a terapia combinada da artemisinina, ou de seus derivados, associados a outros fármacos, por exemplo, a associação artemeter-lumefantrina. Além disso, para prevenir a recorrência da doença, utiliza-se em conjunto, a primaquina, que possui atividade contra os hipnozoítos. Uma vez que o doseamento desses fármacos é essencial para assegurar a qualidade, segurança e eficácia do tratamento, no presente trabalho foram desenvolvidos novos métodos analíticos para determinação de primaquina, artemeter e lumefantrina em comprimidos, usando a Eletroforese Capilar com detecção por absorção no ultravioleta. Para a primaquina, dois métodos foram otimizados, considerando diferentes formas de injeção da amostra, a injeção pelo outlet e injeção múltipla, e um eletrólito formado por Tris/HCl 20/30 mmol L⁻¹ (pH 2,0). As demais condições eletroforéticas foram estudadas e definidas através da implementação de planejamento de experimentos. A principal diferença entre os métodos está na frequência analítica, uma vez que 9 injeções por hora podem ser realizadas pelo método outlet contra 32 injeções por hora para o método de injeção múltipla. Ambos os métodos foram validados, com avaliação dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e posteriormente aplicados para o doseamento de primaquina. Todos os resultados obtidos foram satisfatórios. Além disso, o método de injeção pelo outlet foi aplicado em um estudo qualitativo de degradação forçada de primaquina, em que foram observadas alterações nos sinais do fármaco quando submetido a diferentes condições de estresse, indicando a viabilidade do uso como um método de indicativo de estabilidade. Devido as características dos fármacos, para o artemeter e lumefantrina foi otimizado um método utilizando uma microemulsão composta por 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de dodecil sulfato de sódio. Além disso, o preparo da amostra foi otimizado e, em seguida, o condicionamento entre corridas também foi avaliado. Por fim, foi obtido um método preliminar para o doseamento de artemeter e lumefantrina por Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão.

Palavras-chave: primaquina; lumefantrina; artemeter; eletroforese capilar de zona; cromatografia eletrocínética em microemulsão

ABSTRACT

Malaria is a neglected and infectious tropical disease caused by the parasite of the genus *Plasmodium*, which is endemic in countries with poorer and more vulnerable populations and represents a serious public health problem worldwide. Currently, for uncomplicated malaria caused by *P. falciparum*, combined therapy with artemisinin or its derivatives is recommended, associated with other drugs, for example, the artemether-lumefantrine combination. In addition, primaquine has activity against hypnozoites and is used to prevent the recurrence of the disease. Since the dosage of these drugs is essential to ensure the quality, safety, and efficacy of the treatment, in the present study new analytical methods were developed for the determination of primaquine, artemether, and lumefantrine in tablets, using Capillary Electrophoresis with detection by ultraviolet absorption. For primaquine, two methods were optimized, considering different forms of sample injection, injection through the outlet and multiple injections, and an electrolyte formed by Tris/HCl 20/30 mmol L⁻¹ (pH 2.0). The other electrophoretic conditions were studied and defined by implementing experimental design. The main difference between the methods is in the analytical frequency since 9 injections per hour can be performed by the outlet method versus 32 injections per hour for the multiple injection method. Both methods were validated, with an evaluation of the parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limits, and quantification, and subsequently applied for the primaquine dosing. All the results obtained were satisfactory. In addition, the outlet injection method was applied in a qualitative study of forced degradation of primaquine, in which changes in the drug signals were observed when subjected to different stress conditions, indicating the viability of its use as a method to indicate stability. Due to the characteristics of the drugs, a method was optimized for artemether and lumefantrine using a microemulsion composed of 20 mmol L⁻¹ sodium tetraborate (pH 8.7), 18% v/v acetonitrile, 0.8% v/v hexane, 21% v/v 1-butanol, and 1.2% v/v sodium dodecyl sulfate. In addition, sample preparation and the conditioning between runs were optimized and evaluated. Finally, a preliminary method for determining artemether and lumefantrine using Microemulsion Electrokinetic Chromatography was obtained.

Keywords: primaquine; lumefantrine; artemether; capillary zone electrophoresis; microemulsion electrokinetic chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de risco por município de infecção no Brasil em 2023.	23
Figura 2 - Número de casos registrados da malária por ano nas regiões amazônica e extra-amazônica entre os anos de 2012 a 2025.....	24
Quadro 1 - Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico e sua atividade dentro do ciclo do parasita.....	27
Figura 3 - Estrutura química do difosfato de primaquina.....	28
Figura 4 - Estruturas químicas do artemeter e lumefantrina.	29
Figura 5 - Representação esquemática de um sistema de Eletroforese Capilar.....	41
Figura 6 - Representação esquemática da migração de cátions (+), compostos neutros (N) e ânions (-), de diferentes tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.	45
Figura 7 - Modos de separação em Eletroforese Capilar e suas características.	47
Figura 8 - Modos de injeção de amostras em eletroforese capilar: injeção convencional, pelo lado mais distante do detector (A), injeção pelo <i>outlet</i> , ou seja, pelo lado mais próximo do detector (B), e injeção múltipla, pelo lado mais distante do detector (C).	50
Figura 9 - Espectro de absorção da primaquina na concentração de 10 mg L ⁻¹	67
Figura 10 - Eletroferogramas da primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹ e do MeOH em BGE Tris/HCl 10/20 mmol L ⁻¹ (pH 2,1) (A) e da primaquina na concentração de 250 mg L ⁻¹ e do MeOH em BGE acetato 20 mmol L ⁻¹ (pH 4,7) (B).	69
Figura 11 - Curvas de mobilidade efetiva versus pH para a primaquina e para os componentes do eletrólito (A) e região expandida da primeira inflexão da curva da primaquina, entre 19,6 e 20,6 cm ² V ⁻¹ s ⁻¹ (B).	70
Figura 12 - Eletroferogramas da PQN na concentração de 100 mg L ⁻¹ , do BGE, da água e do MeOH.	72
Figura 13 - Eletroferogramas da primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹ , e injeção hidrodinâmica, pelo <i>outlet</i> , 30 mbar por 5 s e 50 mbar por 3s.	73
Figura 14 - Eletroferogramas dos ensaios do planejamento fatorial 3 ² , referente ao método com injeção pelo <i>outlet</i> , e primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹	75
Figura 15 - Eletroferogramas do estudo de repetibilidade dos ensaios A, B e C do método com injeção pelo <i>outlet</i> , e primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹	77
Figura 16 - Eletroferogramas do estudo de repetibilidade após condicionamento com purga de HCl 1 mol L ⁻¹ , do método com injeção pelo <i>outlet</i> e primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹	78

Figura 17 - Avaliação da seletividade do método com injeção pelo <i>outlet</i>	79
Figura 18 - Curva analítica da primaquina no método de injeção pelo <i>outlet</i>	81
Figura 19 - Eletroferogramas do estudo de degradação forçada da primaquina em diferentes condições de estresse (A) e espectros de absorção UV referentes aos produtos de degradação (PD) (B).	85
Figura 20 - Eletroferogramas dos ensaios do planejamento Box-Benhken 3 ³ , referente ao método com injeção múltipla, com a primaquina na concentração de 100 mg L ⁻¹	88
Figura 21 - Avaliação da seletividade do método com injeção múltipla.	93
Figura 22 - Curva analítica da primaquina no método de injeção com injeção múltipla.	95
Figura 23 - Espectro de absorção da lumefantrina na concentração de 10 mg L ⁻¹	100
Figura 24 - Espectro de absorção do artemeter na concentração de 1000 mg L ⁻¹	101
Figura 25 - Eletroferogramas do artemeter nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ (linha verde escuro) e de 2000 mg L ⁻¹ (linha verde claro) e espectro UV.	102
Figura 26 - Eletroferogramas da lumefantrina na concentração de 500 mg L ⁻¹ e espectro UV.	103
Figura 27 - Eletroferograma da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para o artemeter e 500 mg L ⁻¹ para a lumefantrina.	104
Figura 28 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mgL ⁻¹ para o artemeter e 50 mg L ⁻¹ para a lumefantrina.	105
Figura 29 - Eletroferogramas do artemeter na concentração de 1000 mg L ⁻¹ e da lumefantrina na concentração de 50 mg ⁻¹ , no capilar de 50 µm.	106
Figura 30 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 50 mg L ⁻¹ para lumefantrina, no capilar de 50 µm.	107
Figura 31 - Eletroferogramas do artemeter na concentração de 1000 mg L ⁻¹ e da lumefantrina na concentração de 100 mg L ⁻¹ , no capilar TSP de 50 µm.	108
Figura 32 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 100 mg L ⁻¹ para lumefantrina, no capilar de 50 µm.	109
Figura 33 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 6000 mg L ⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE.....	110
Figura 34 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 6000 mg L ⁻¹ para lumefantrina, diluída em EtOH (A), em ACN (B), em TBS 10 mmol L ⁻¹ (C), em TBS 10 mmol L ⁻¹ + 10% EtOH (D), em TBS 10 mmol L ⁻¹ + 10% ACN (E), em TBS 20 mmol L ⁻¹ (F), em TBS 20 mmol L ⁻¹ + 10% EtOH (G), e em TBS 20 mmol L ⁻¹ + 10% ACN (H).	112

Figura 35 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 50 mg L ⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE + 1% de ácido acético.....	115
Figura 36 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L ⁻¹ para artemeter e 6000 mg L ⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE + 1% de ácido acético.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos analíticos para a separação enantiomérica de primaquina por Eletroforese Capilar, em ordem cronológica.....	35
Tabela 2 - Métodos de doseamento de artemeter e lumefantrina por Eletroforese Capilar, em ordem cronológica.	39
Tabela 3 - Análise de Variância para o ajuste do modelo através do método dos mínimos quadrados.....	55
Tabela 4 - Valores dos parâmetros necessários para os cálculos das mobilidades eletroforéticas da primaquina.	68
Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3^2 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas do método com injeção pelo outlet.....	73
Tabela 6 - Matriz de planejamento fatorial 3^2 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas do método com injeção pelo outlet.....	74
Tabela 7 - Estudo de repetibilidade dos ensaios A, B e C do método com injeção pelo outlet.	76
Tabela 8 - Valores de área e RSD (%) para obtenção da curva analítica da primaquina no método de injeção pelo outlet.....	80
Tabela 9 - Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado para ajuste do modelo do método com injeção pelo outlet.....	82
Tabela 10 - Porcentagem de recuperação média para a primaquina pelo método com injeção pelo outlet.	83
Tabela 11 - Quantificação de primaquina em comprimidos pelo método com injeção pelo outlet.	84
Tabela 12 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas para o método com injeção múltipla.	87
Tabela 13 - Matriz de planejamento Box-Behnken 3^3 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas para o método com injeção múltipla.....	87
Tabela 14 - Estudo de repetibilidade para o ensaio 2 do método com injeção múltipla.	90
Tabela 15 - Estudo de repetibilidade para o experimento 6 do método com injeção múltipla.	90
Tabela 16 - Estudo de repetibilidade para o experimento 9 do método com injeção múltipla.	91
Tabela 17 - Estudo de repetibilidade para o experimento 13 do método com injeção múltipla.	91

Tabela 18 - Estudo de repetibilidade para o experimento 14 do método com injeção múltipla.	92
Tabela 19 - Valores de área e RSD (%) para obtenção da curva analítica da primaquina no método com injeção múltipla.	94
Tabela 20 - Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado para ajuste do modelo do método com injeção múltipla.	96
Tabela 21 - Porcentagem de recuperação média para a primaquina pelo método com injeção múltipla.....	97
Tabela 22 - Quantificação de primaquina em comprimidos pelo método com injeção múltipla.	98
Tabela 23 - Valores de área e tempo de migração para o artemeter e a lumefantrina em diferentes solventes.	111
Tabela 24 - Valores de área média e tempo de migração médio, associados aos seus RSD, para o artemeter e lumefantrina, em diferentes condicionamentos entre corridas.	113
Tabela 25 - Valores de área e tempo de migração para cada repetição, e valores médios de área e tempo de migração, e RSD, para o artemeter e a lumefantrina, diluídos em BGE, utilizando o condicionamento entre corridas 1.....	114
Tabela 26 - Valores de área e tempo de migração para cada repetição, e valores médios de área e tempo de migração, e RSD, para o artemeter e a lumefantrina, diluídos em BGE + 1% ácido acético, utilizando o condicionamento entre corridas 1.	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18C6	Éter 18-coroa-6
ACN	Acetonitrila
ACT	Terapia combinada da artemisinina (do inglês, <i>Artemisinin based combined therapy</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Artemeter
BGE	Eletrólito (do inglês, <i>background electrolyte</i>)
C ⁴ D	Detector condutométrico sem contato (do inglês, <i>Capacitively-coupled contactless conductivity detector</i>)
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese Capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CM- α -CD	Carboximetil- α -CD
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
d. e.	Diâmetro externo
d. i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês, <i>Diode array detector</i>)
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês, <i>Electroosmotic flow</i>)
FDC	Dose fixa combinada (do inglês, <i>Fixed-dose combination</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -CD
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LUM	Lumefantrina
MEEKC	Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão (do inglês, <i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i>)
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar (do inglês, <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)

MS	Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Mass spectrometry</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD	Produto de degradação, do inglês, <i>product of degradation</i>)
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PQN	Primaquina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
SU- β -CD	Sulfato- β -CD
TBS	Tetraborato de sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

A_A	área do pico do analito na amostra
A_{A+P}	área do pico do analito na amostra com adição do padrão
A_P	área do pico do padrão
a	coeficiente angular
b	coeficiente linear
C_A	concentração do analito
E	campo elétrico
F_{cal}	valor de F calculado
F_{tab}	valor de F tabelado
$H_{MÁX}$	altura máxima do pico do analito
$H_{MÍN}$	altura mínima do pico do analito
k	número de fatores do planejamento
L_{ef}	comprimento efetivo do capilar
L_{tot}	comprimento total do capilar
m	número de níveis distintos da variável independente
MQ_{ep}	média quadrática dos erros puros
MQ_{faj}	média quadrática da falta de ajuste
MQ_{reg}	média quadrática da regressão
MQ_{res}	média quadrática dos resíduos
n	número de picos (3, 6 ou 9)
N	número de níveis do planejamento
$n = \sum n_i$	número total de medidas
n_i	número de repetições no nível i
n_{ENS}	número de ensaios do planejamento
n_{PC}	número de réplicas no ponto central do planejamento
p	número de parâmetros do modelo
pH	potencial hidrogeniônico
pKa	logaritmo negativo da constante de dissociação ácida (K_a)
q	carga do analito
r	coeficiente de correlação
$R \%$	recuperação

r_i	raio hidrodinâmico
$R_{i,i+1}$	resolução entre pares de picos adjacentes
R_{med}	resolução media entre os pares de picos
R_{min}	resolução mínima aceitável (1.0)
R_{ot}	resolução ideal ou desejada (1.5)
s	desvio padrão
s_b	desvio padrão da linha de base
t_{eo}	tempo de migração do fluxo eletrosmótico ou de um composto neutro
t_m	tempo de migração do analito
t_n	tempo de migração do último pico
t_{PQN}	tempo de migração da primaquina
v/v	volume/volume
V	voltagem aplicada
x	variável independente
\bar{x}	média aritmética
y	variável dependente
y_{im}	média das determinações repetidas no nível i
y_m	média de todos os valores de y
α_i	fração de distribuição ou grau de ionização
η	viscosidade
μ_{Cl}	mobilidade eletroforética do cloreto
μ_{ef}	mobilidade efetiva
μ_{eo}	mobilidade eletrosmótica
μ_{ep}	mobilidade eletroforética
μ_j	mobilidade iônica de cada espécie j
μ_{obs}	mobilidade observada
μ_{PQN}	mobilidade eletroforética do primaquina
μ_{Tris}	mobilidade eletroforética do Tris
v_{eo}	velocidade do fluxo eletrosmótico
v_{ep}	velocidade eletroforética

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	MALÁRIA.....	22
1.2	TRATAMENTO DA MALÁRIA.....	24
1.3	ANTIMALÁRICOS	26
1.3.1	Primaquina	28
1.3.2	Artemeter e Lumefantrina	28
1.3.3	Doseamento de fármacos antimaláricos	29
1.4	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	30
1.5	REFERENCIAL TEÓRICO PARA DOSEAMENTO DE ANTIMALÁRICOS EM COMPRIMIDOS	31
1.5.1	Primaquina	32
1.5.2	Artemeter e Lumefantrina	37
1.6	ELETROFORESE CAPILAR	40
1.6.1	Instrumentação	40
1.6.2	Princípios de separação	41
1.6.3	Modos de separação	46
1.6.4	Detectores	48
1.6.5	Métodos de Injeção	48
1.7	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	50
1.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	51
1.8.1	Seletividade	52
1.8.2	Linearidade	53
1.8.3	Precisão	56
1.8.4	Exatidão	57
1.8.5	Limites de detecção e quantificação	57
2	OBJETIVOS	59
2.1	OBJETIVO GERAL	59
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	60
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	62
3.2.1	Preparo da amostra de primaquina para o doseamento	62

3.2.2	Preparo da amostra de primaquina para o estudo da degradação	62
3.2.3	Preparo da amostra de artemeter e lumefantrina para o doseamento	62
3.3	INSTRUMENTAÇÃO.....	63
3.4	PROCEDIMENTO PARA AS VALIDAÇÕES DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRIMAQUINA.....	64
3.5	PROCEDIMENTO PARA OS PLANEJAMENTOS DE EXPERIMENTOS.....	65
3.6	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1	DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV UTILIZANDO INJEÇÃO PELO OUTLET	67
4.1.1	Seleção do comprimento de onda	67
4.1.2	Otimização do eletrólito e das condições eletroforéticas de análise	68
4.1.3	Validação do método analítico	79
4.1.3.1	Seletividade.....	79
4.1.3.2	Linearidade	80
4.1.3.3	Precisão	82
4.1.3.4	Exatidão	82
4.1.3.5	Limites de Detecção e de Quantificação.....	83
4.1.4	Quantificação de primaquina em comprimidos.....	83
4.1.5	Determinação de produtos de degradação da primaquina	84
4.2	DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV UTILIZANDO INJEÇÃO MÚLTIPLA.....	85
4.2.1	Otimização das condições eletroforéticas de análise.....	86
4.2.2	Validação do método analítico por injeção múltipla.....	93
4.2.2.1	Seletividade.....	93
4.2.2.2	Linearidade	94
4.2.2.3	Precisão	96
4.2.2.4	Exatidão	96
4.2.2.5	Limites de Detecção e de Quantificação.....	97
4.2.3	Quantificação de primaquina em comprimidos.....	97
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV	98

4.4	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA E ARTEMETER POR MEECK-UV	99
4.4.1	Seleção do comprimento de onda e escolha do solvente	99
4.4.2	Otimização do eletrólito e das condições eletroforéticas	101
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
	REFERÊNCIAS	121
	APÊNDICE I – Produção científica durante o doutorado.....	127
	APÊNDICE II – Participação em projetos	130
	APÊNDICE III – Participação em eventos.....	132
	APÊNDICE IV – Coorientação de projetos.....	133
	APÊNDICE V – Participação em bancas.....	134

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas constituem um grupo de vinte doenças endêmicas em regiões tropicais e subtropicais, que afetam as populações mais pobres e vulneráveis, com acesso limitado a um serviço de saúde adequado (World Health Organization, 2023a, 2023b). Dentre essas doenças estão a tuberculose, a doença de Chagas, a dengue e a malária, que continuam sendo as causas das altas taxas de mortalidade e morbidade em todo mundo, especialmente na África, Ásia e América Latina (Fiocruz, 2025; Pan American Health Organization, 2022).

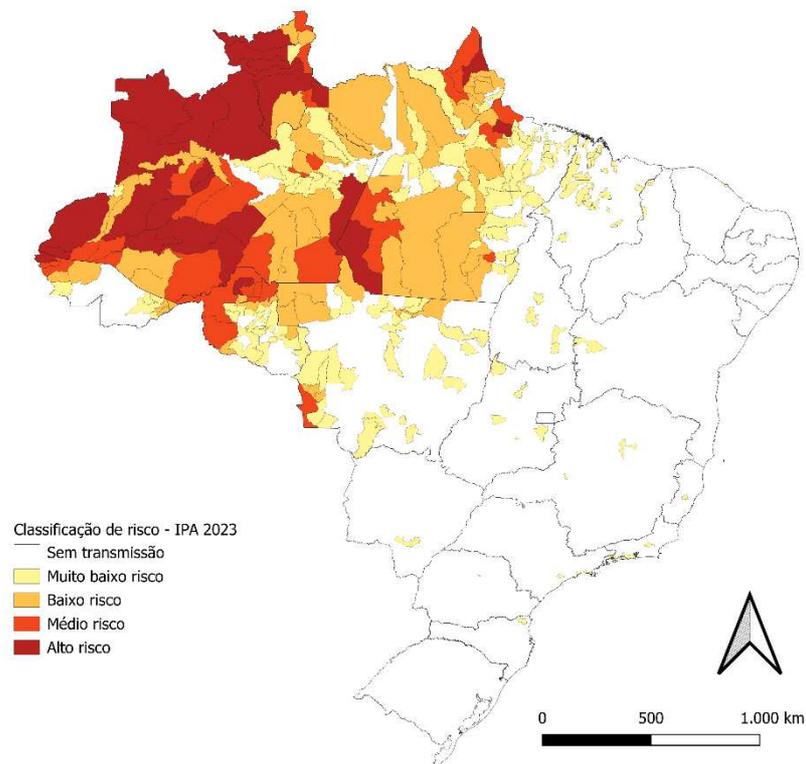
A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 263 milhões de casos de malária foram registrados em 2023 envolvendo 83 países. A malária ainda é um grave problema de saúde pública no mundo, o que indica a necessidade de desenvolvimento de mais políticas públicas visando o seu combate, diagnóstico e tratamento (Brasil, 2024a).

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa causada pelo parasita do gênero *Plasmodium* e sua transmissão ocorre através da picada dos mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* infectadas, com os sintomas mais comuns de febre alta, calafrios e dor de cabeça (Brasil, 2009). As espécies que podem causar a doença em humanos são *P. falciparum*, o *P. vivax*, o *P. malariae*, o *P. ovale* e o *P. knowlesi* (Brasil, 2024b). No Brasil, há três espécies predominantes, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo que o *P. vivax* é responsável por aproximadamente 90% dos casos. O *P. ovale* é encontrado em algumas regiões da África e nos casos importados de malária no Brasil (Brasil, 2024b).

A área endêmica no Brasil se encontra na região amazônica, que concentra 99% dos casos, devido à grande quantidade de mosquitos vetores, alto índice de pluviosidade e proximidades à mata, além das condições de moradia e higiene inadequadas para a população (Brasil, 2024a; Fiocruz, 2019). Na região extra-amazônica, também há registros de casos da doença, principalmente nos estados da região Sudeste, onde há a Mata Atlântica, e cerca de 80% dos casos são importados de regiões endêmicas dentro do Brasil quanto fora do país (Brasil, 2024a). Esses casos podem ser até mais letais, pois os sintomas são semelhantes a outras doenças e pode conduzir a um diagnóstico errôneo (Brasil, 2024a). Na Figura 1 pode ser observado o mapa de risco por município de infecção no Brasil no ano de 2023.

Figura 1 - Mapa de risco por município de infecção no Brasil em 2023.

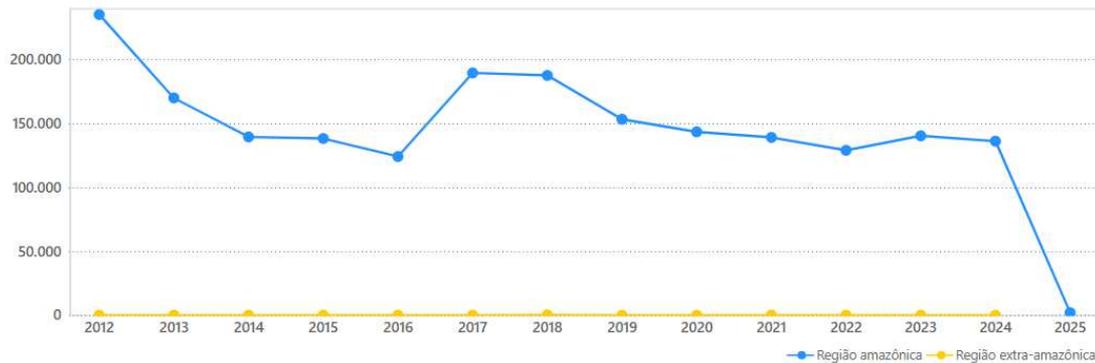


Fonte: Adaptado de Brasil, 2024a.

Os esforços do Ministério da Saúde nos estados e municípios para a prevenção, controle e diminuição da malária mostraram bons resultados no período de 2010 a 2016, com redução constante nos casos na região amazônica. Porém, constatou-se um aumento de cerca de 53% de casos em 2017 quando comparados a 2016, número que reduziu em 1% em 2018 (Brasil, 2024a). Esse aumento expressivo no número de casos pode estar relacionado às condições climáticas na região, mas também a uma possível redução de ações de controle e vigilância em virtude da diminuição constante nos anos anteriores.

Entretanto, foram observados novas quedas no número de casos notificados entre 2019 e 2022, chegando a 31% em 2022 quando comparados a 2018. Os dados mais recentes do Ministério da Saúde indicam que, em 2023, houve um aumento de aproximadamente de 9% em relação a 2022. Já em 2024, o número de casos permaneceu próximo ao de 2023, como pode ser verificado na Figura 2, que indica o número de casos de malária por ano nas regiões amazônica e extra-amazônica (Brasil, 2024a). Em janeiro de 2025, foram registrados 1975 casos da doença.

Figura 2 - Número de casos registrados da malária por ano nas regiões amazônica e extra-amazônica entre os anos de 2012 a 2025.



Fonte: Painel Epidemiológico (Brasil, 2024a).

O controle da doença é dependente da proteção individual, de um diagnóstico específico e rápido, e do tratamento adequado e imediato com antimaláricos.

1.2 TRATAMENTO DA MALÁRIA

O tratamento da malária é realizado com medicamentos por via oral, se consolidando como a melhor forma de reduzir a morbidade e a mortalidade, além de 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 (Brasil, 2021; World Health Organization, 2014).

A infecção começa quando os parasitos (esporozoítos) são introduzidos na pele através da picada do mosquito vetor e invadem as células do fígado (hepatócitos). Dentro destas células, os esporozoítos se multiplicam e dão origem a milhares de novos parasitos (merozoítos), que rompem os hepatócitos, caem na circulação sanguínea e invadem as hemácias. É nesse ponto que começa a segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea, onde há o aparecimento dos sintomas da malária. No fígado, o desenvolvimento do parasito acontece entre uma e duas semanas. Entretanto, para algumas espécies de *Plasmodium*, alguns parasitos ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos) e são responsáveis pelas recaídas da doença. Já na fase sanguínea, os merozoítos rompem as hemácias infectadas e entram em outras saudáveis, gerando assim ciclos de multiplicação eritrocitária. Depois de alguns ciclos, os merozoítos se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos, e que, ao serem ingeridos pelos insetos vetores, vão se fecundar, originando o ciclo sexuado do parasito e a formação de esporozoíto.

O esporozoítio é a forma que é transmitida ao indivíduo no momento da picada e, portanto, o ciclo evolutivo recomeça (Brasil, 2021).

O sucesso do tratamento da malária é baseado em três objetivos principais para alcançar o parasito em pontos diferentes do ciclo evolutivo (Brasil, 2021):

- a) interromper a reprodução do parasito no sangue, que está diretamente relacionada a patogenia e as manifestações clínicas da infecção;
- b) eliminar as formas dormentes do parasito no fígado (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, para evitar recaídas;
- c) interromper a transmissão do parasito impedindo o desenvolvimento de formas sexuadas dos mesmos (gametócitos).

Logo, a escolha do esquema de tratamento de forma adequada e específica para cada caso é essencial para garantir a melhor adesão dos pacientes. No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) é uma política nacional do Ministério da Saúde que objetiva a redução da letalidade, gravidade e incidência da doença, além da eliminação da transmissão em áreas urbanas, e orienta o tratamento e a disponibilização dos medicamentos em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS). Dentro do programa, há o Guia de Tratamento da Malária no Brasil que é um manual terapêutico que apresenta as informações pertinentes quanto a recomendação e ao uso dos medicamentos antimaláricos preconizados no país (Brasil, 2021).

A OMS e o Guia de Tratamento da Malária no Brasil recomendam a utilização da Terapia Combinada da Artemisinina (ACT, do inglês *artemisinin based combined therapy*) para o tratamento da malária não complicada causada pelo *P. vivax* e pelo *P. falciparum* (World Health Organization, 2022; Brasil, 2021). As combinações de fármacos permitem o aumento da eficácia do tratamento, reduzindo a transmissão da doença, o tempo de tratamento e o risco de o parasita desenvolver resistência aos medicamentos (World Health Organization, 2022, 2020). No caso de infecções causadas pelo *P. falciparum*, para prevenir a recorrência da doença, utiliza-se em conjunto com a ACT, no primeiro dia, um antimalárico da classe das 8-aminoquiloninas, que possuem atividade contra os hipnozoítos (World Health Organization, 2022; Brasil, 2021). A primaquina é o principal fármaco dessa classe de compostos disponível e liberado para uso no Brasil (Brasil, 2021).

O esquema de tratamento recomendado para as infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* evidencia o uso da combinação de cloroquina e primaquina para promover a eliminação do parasito na forma sanguínea e hepática. Em alguns casos, a OMS recomenda o uso da ACT combinada com a primaquina. Para infecções mista por *P. falciparum* e *P. vivax* (ou *P. ovale*)

não complicadas, a recomendação é tratar o com a ACT associando a primaquina por sete dias (World Health Organization, 2022; Brasil, 2021).

A OMS indica as seguintes combinações de fármacos: artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina, dihidroartemisinina-piperaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina e artesunato-pironaridina. Em diversos países, as associações artemeter-lumefantrina e artesunato-mefloquina e são as terapias de primeira escolha para tratar a malária causada pelo *P. falciparum* sem complicações devido à resistência do *plasmodium* aos tratamentos convencionais com a cloroquina (World Health Organization, 2022; Brasil, 2021). A denominação conhecida por dose fixa combinada (FDC, do inglês *fixed-dose combination*) é utilizada para identificar 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 denominadas como 2-FDC.

1.3 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 o Quadro 1:

Quadro 1 - Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico e sua atividade dentro do ciclo do parasita.

Grupo Químico	Principais Fármacos	Atividade
4-Aminoquinolinas	Cloroquina, Hidroxicloroquina, Amodiaquina, Piperaquina	Esquizonticida sanguíneo de ação rápida e gametocitocida.
8-Aminoquinolinas	Primaquina, Tafenoquina	Esquizonticidas teciduais e gametocitocida e agem em outras fases do ciclo.
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina, Artemeter, Artesunato e Diidroartemisinina	Esquizonticidas sanguíneos.
Biguanidas	Proguanil, Cloroproguanil	Esquizonticida tecidual e sanguíneo de ação lenta.
Diaminopirimidinas	Pirimetamina	Esquizonticida tecidual e sanguíneo de ação lenta.
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo
Hidroxi-naftoquinonas	Atovaquona	Esquizonticida sanguíneo
4-Metanolquinolinas	Quinina, Quinidina, Mefloquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida
9-Fenantrenometanóis	Halofantrina	Esquizonticida sanguíneo
Sulfonamidas	Sulfadoxina, Sulfametopirazina	Esquizonticida sanguíneo
Sulfonas	Dapsona	Esquizonticida sanguíneo
Tetraciclinas	Doxiciclina, Tetraciclina	Esquizonticida sanguíneo e tecidual

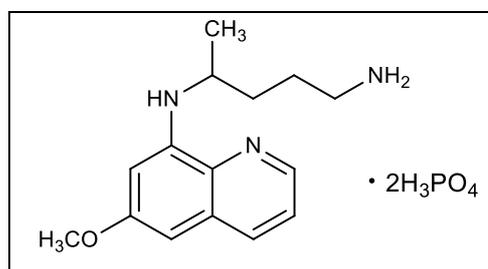
Fonte: Adaptado de Sweetman (2009).

1.3.1 Primaquina

O difosfato de primaquina (PQN) apresenta-se na forma de um pó cristalino de coloração alaranjada, solúvel em água, praticamente insolúvel em álcool etílico, com massa molar de $455,34 \text{ g mol}^{-1}$, valores de $\text{pK}_{a1} = -1,3$, $\text{pK}_{a2} = 3,20$ e $\text{pK}_{a3} = 10,4$, e máximo de absorção em 206 e 265 nm (Brasil, 2024c; World Health Organization, 2024; American Chemical Society, 2024; Lamalle et al., 2012; Nair et al., 2012; Hufford et al., 1983). É importante destacar que a atribuição dos três valores de pK_a (referentes ao ácido conjugado) pode ser estimada da seguinte forma: o pK_{a1} corresponde ao grupo amina secundária/amina aromática, o pK_{a2} corresponde ao nitrogênio do anel quinolinico, e o pK_{a3} corresponde ao grupo amina alifática primária (Hufford et al., 1983). A estrutura química é apresentada na Figura 3.

No Brasil, comprimidos contendo difosfato de primaquina (15 mg e 5 mg) são disponibilizados pelo SUS, por meio do PNCM, e são fabricados pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz).

Figura 3 - Estrutura química do difosfato de primaquina.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.3.2 Artemeter e Lumefantrina

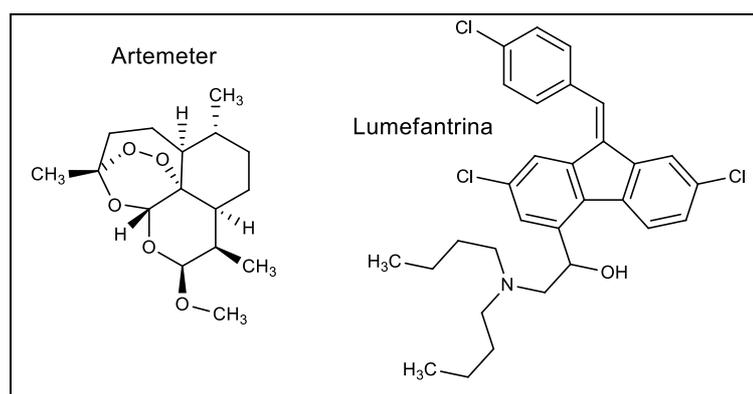
O artemeter (ATM), é um éter metílico derivado da artemisinina, apresenta-se na forma de um pó fino, cristalino e branco, com massa molar de $298,38 \text{ g mol}^{-1}$, não possui grupos ionizáveis e ausência de duplas ligações e grupos cromóforos. Apresenta baixa polaridade, é insolúvel em água, baixa solubilidade em solventes aquosos, inclusive na presença de tensoativos, muito solúvel em diclorometano (DCM) e acetona, facilmente solúvel em etanol, metanol e acetato de etila (Brasil, 2024c; World Health Organization, 2024; American Chemical Society, 2024; César, 2009; César et al., 2008).

A lumefantrina (LUM) apresenta-se na forma de um pó cristalino e amarelo, com massa molar de $528,94 \text{ g mol}^{-1}$, $\text{pK}_{a1} = 8,71$ e $\text{pK}_{a2} = 13,44$, insolúvel em água, baixa solubilidade em

solventes aquosos, inclusive na presença de tensoativos, solúvel em diclorometano, ligeiramente solúvel em metanol, etanol e acetonitrila (World Health Organization, 2024; American Chemical Society, 2024; César, 2009; César et al., 2008). A atribuição dos dois valores de pK_a (referentes ao ácido conjugado) pode ser estimada da seguinte forma: o pK_{a1} corresponde ao grupo amina terciária e o pK_{a2} corresponde ao grupo OH (Amin et al., 2013b). A adição de pequena quantidade de ácido acético 1% nos solventes orgânicos aumenta a solubilidade da LUM nos mesmos (César, 2009; César et al., 2008).

A associação ATM-LUM é um 2-FDC (20 mg de ATM e 120 mg de LUM) denominado Coartem® e disponibilizado pela farmacêutica Novartis, na forma farmacêutica comprimidos. Os FDC's proporcionam muitos benefícios terapêuticos, mas também trazem desafios para a indústria farmacêutica, sendo um deles a dificuldade analítica para a quantificação simultânea. As estruturas químicas do artemeter e da lumefantrina são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas químicas do artemeter e lumefantrina.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.3.3 Doseamento de fármacos antimaláricos

O doseamento dos fármacos antimaláricos possui uma grande importância para o monitoramento terapêutico e para garantir a qualidade das formulações farmacêuticas disponibilizadas para a população. A análise desses medicamentos não é apenas uma questão de garantir produtos farmacêuticos de alta qualidade, mas também um passo crucial para prevenir possíveis danos aos pacientes. A administração de uma dosagem incorreta pode levar ao aumento dos efeitos colaterais e toxicidade, resistência a medicamentos e ineficiência terapêutica, representando um risco significativo à saúde do paciente.

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam simples, eficientes e rápidos para uso no monitoramento terapêutico e no controle de qualidade em análises de rotina torna-se uma questão de extrema relevância.

1.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Além do doseamento de fármacos, estudos de estabilidade são recomendados para avaliar a integridade química, física e terapêutica da formulação farmacêutica, garantindo a qualidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) durante todo o período de armazenamento e uso. A estabilidade dos produtos farmacêuticos é dependente de fatores ambientais, como luz, temperatura e umidade, e das propriedades físicas e químicas do composto, além de fatores externos, como o armazenamento, processo de fabricação e embalagens (Silva et al., 2009). No Brasil, a RDC nº 53 de 2015 estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação (PD, do inglês *product of degradation*) em medicamentos (Brasil, 2015).

Especificamente, um estudo de degradação forçada é importante para prever os PDs pertencentes ao IFA, quando a formulação farmacêutica é submetida a diferentes condições de estresse, e para desenvolver métodos indicativos de estabilidade (Brasil, 2015; Silva et al., 2009). Tanto o IFA quanto o produto acabado são mantidos sob condições de estresse para avaliar a geração ou não de algum PDs. As condições de estresse que devem ser consideradas durante o estudo de degradação são (Brasil, 2015):

- I. Aquecimento;
- II. Umidade
- III. Solução ácida (hidrólise ácida);
- IV. Solução básica (hidrólise básica);
- V. Solução oxidante (oxidação);
- VI. Exposição fotolítica;
- VII. Íon metálicos.

É importante ressaltar que os estudos de degradação forçada não são definidos na literatura de forma explícita, ou seja, não há relatos de métodos de referência para serem seguidos. As resoluções e guias da ANVISA fornecem definições dos estudos de degradação forçada, mas não determinam como realizar o procedimento, a sua aplicabilidade e o tempo de exposição, sendo necessário que as indústrias farmacêuticas desenvolvam seus próprios procedimentos operacionais (Brasil, 2015). Entretanto, é possível ajustar os procedimentos para

se obter entre 10% e 30% de degradação, uma vez que em porcentagens mais altas pode ocorrer a formação de produtos que não se formariam naturalmente.

1.5 REFERENCIAL TEÓRICO PARA DOSEAMENTO DE ANTIMALÁRICOS EM COMPRIMIDOS

Na literatura científica há diversos trabalhos que objetivam o doseamento dos fármacos em formulações farmacêuticas e em plasma humano.

Em 2024, Souza e colaboradores publicaram um estudo de revisão sobre a determinação de antimaláricos em formulações farmacêuticas e em plasma humano por Eletroforese Capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) no período de 2000 a 2024 (Souza et al., 2024). Avaliando os relatos e métodos existentes, as principais diferenças mencionadas estão nos diferentes componentes do eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*), bem como nos parâmetros instrumentais, como a voltagem e injeção, além do tipo de detector utilizado.

Amin e colaboradores (2013) publicaram um estudo de revisão sobre os métodos não-quirais desenvolvidos para análise de antimaláricos por CE em diferentes aplicações, como o controle de qualidade de fármacos, a análise forense, e a análise de alimentos e ambiental (Amin et al., 2013a).

Penna e colaboradores (2021) publicaram um estudo de revisão sobre a determinação de antimaláricos em formulações farmacêuticas e em plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) no período de 2010 a 2020 (Penna et al., 2021). Resende et al. (2019) publicaram um estudo de revisão sobre determinação de ATM e LUM em amostras biológicas no período de 2000 a set/2018 (Resende et al., 2019). Em ambos os trabalhos as principais diferenças relatadas entre os métodos estão nos distintos preparos de amostras, principalmente para as amostras biológicas (extração líquido-líquido, microextração em fase líquida, precipitação de proteínas e extração em fase sólida), na composição da fase móvel e no tipo de detector (UV ou espectrometria de massas).

Lamalle e colaboradores (2012a) desenvolveram um método genérico por Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*) para a separação de 15 antimaláricos, entre eles a PQN e o ATM, como ferramenta de detecção de falsificação de medicamentos (Lamalle et al. 2012). Uma vez que os antimaláricos possuem valores de pKa diferentes, o grau de ionização de cada um deles será

diferente em um mesmo pH, e, por isso, a vantagem da separação de compostos carregadores e neutros em uma única corrida fez com que a MEKC fosse adequada para o estudo. Para encontrar a condição de separação adequada a todos os compostos, foi realizado um planejamento de experimentos, considerando os quatro parâmetros que mais afetam a separação de todos os medicamentos: pH, concentração de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), proporção de acetonitrila (ACN) e temperatura.

O efeito do pH foi avaliado na faixa de pH de 5,0 a 10,0, uma vez que o sistema se mostrou instável em valores de pH fora dessa faixa. O SDS possui uma concentração micelar crítica de $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e em concentrações superiores a 90 mmol L^{-1} pode ocorrer aumento da viscosidade e mudança de fases, fazendo com que seu efeito foi estudado na faixa de 20 a 90 mmol L^{-1} . A seletividade e a resolução podem ser aprimoradas com o uso de um solvente orgânico como componente do BGE, e, para esse propósito, a proporção de ACN foi avaliada em diferentes percentuais, de 10 a 40%. Acima de 40% de ACN as micelas deixam de se formar porque o meio não é polar o suficiente para favorecer a agregação micelar. O efeito da temperatura foi estudado entre $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para verificar se o método poderia ser aplicado em laboratórios sem controle adequado de temperatura. Após a avaliação do planejamento, a condição ideal foi fixada em eletrólito composto por tampão fosfato em pH 6,6, 29 mmol L^{-1} de SDS e 36% de ACN, análise realizada a $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e detecção em 210 nm. Com esses parâmetros, dois analitos apresentaram o mesmo tempo de migração, enquanto os outros 13 compostos foram separados em menos de 10 minutos (Lamalle et al. 2012).

Nas próximas subseções serão apresentados os métodos analíticos relatados na literatura que abordam a determinação de PQN, ATM e LUM em formulações farmacêuticas.

1.5.1 Primaquina

A Farmacopeia Brasileira indica um método volumétrico, a titulação em meio não aquoso com ácido perclórico e determinação do ponto final potenciometricamente, para o doseamento de PQN em matéria-prima e comprimidos (Brasil, 2024c).

A Farmacopeia Internacional descreve um método volumétrico, a titulação de nitrito com solução de nitrito de sódio como titulante para a determinação da PQN em matéria-prima e comprimido (World Health Organization, 2024). Entretanto, todos esses procedimentos descritos nas farmacopeias utilizam grandes quantidades de reagentes orgânicos e de volumes de amostra, fatores que são prejudiciais ao meio ambiente, ou apresentam elevado tempo de duração.

Considerando técnicas analíticas de separação, há poucos relatos utilizando a CE para o doseamento de PQN em formulações farmacêuticas. Rodrigues descreve um método por Eletroforese Capilar de Zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) para determinar PQN e outros seis antimaláricos utilizando um BGE composto por 45 mmol L⁻¹ de tampão citrato (pH 4,5) com detecção em 214 nm (Rodrigues, 2012).

Entretanto, há relatos quanto ao uso da CE para separação enantiomérica da PQN em padrões e em comprimidos (Németh et al., 2011; Elbashir et al., 2010, 2009a, 2009b, 2008; Du et al., 2002a, 2002b; Zhang et al., 2002). Na Tabela 1 estão reunidos os métodos encontrados na literatura para a separação enantiomérica da PQN em soluções padrões e comprimidos utilizando a CE, nos últimos 24 anos. A separação enantiomérica é importante, principalmente na indústria farmacêutica, devido a diversos compostos apresentarem enantiômeros que podem ter atividades biológicas distintas.

O primeiro método relatado foi a separação dos enantiômeros de PQN em comprimidos utilizando um BGE composto por hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e tampão trifosfato (pH 2,5) realizado por Elbashir e colaboradores (Elbashir et al., 2008). A condição ideal foi alcançada após avaliar o tipo e a concentração da ciclodextrina (CD), a composição do tampão, a voltagem, a temperatura e o modo de injeção. Após a validação do método, foi aplicado a amostras reais e demonstrou ser mais adequado do que outros métodos previamente relatados por Zhang et al., que apresentavam menor resolução entre os pares de enantiômeros e utilizavam derivados de CD que precisavam ser sintetizados (Zhang et al., 2002), e por Du et al., que usava um capilar com revestimento duplo com polímeros, o *polybrene* e o ácido colomínico (Du et al., 2002a, 2002b).

Nos trabalhos seguintes, o grupo de pesquisa focou no estudo da separação dos enantiômeros de PQN e da quinocida, sua impureza, em comprimidos (Elbashir et al., 2009a, 2009b). Os experimentos foram realizados utilizando a mesma composição de BGE mencionada anteriormente, e a separação foi alcançada em menos de 5 minutos. Após avaliar os parâmetros de validação, o método foi aplicado a comprimidos contendo PQN. Os resultados indicaram que o pico de quinocida foi identificado entre os picos dos enantiômeros de PQN, e uma pequena concentração de quinocida foi encontrada nas amostras, mas estava em conformidade com a legislação (Elbashir et al., 2009a). Uma combinação de CD foi utilizada para complementar o estudo, em que a sulfato- β -CD (SU- β -CD) foi adicionada ao BGE, já composto por HP- γ -CD, e o sistema eletroforético foi operado com polaridade invertida para reduzir o tempo de migração. Essas condições permitiram a separação dos pares de enantiômeros conforme o aumento de pH de 3,0 para 4,0 (Elbashir et al., 2009a).

Em seguida, outros trabalhos do mesmo grupo descrevem a separação de PQN e quinocida utilizando β -CD ou éter 18-coroa-6 (18C6) como seletor quiral (Elbashir et al., 2009b, 2010). O primeiro trabalho concentrou-se em investigar a interação do analito com cada seletor quiral para formar complexos de inclusão, utilizando modelagem molecular semiempírica e compreendendo o papel do reconhecimento quiral (Elbashir et al., 2010). Como esperado, a alta estabilidade do complexo está diretamente relacionada aos maiores tempos de migração dos analitos, e a separação dos isômeros foi obtida quando as estabilidades de complexação de cada seletor quiral com os analitos apresentaram uma diferença significativa. Além disso, os complexos de inclusão mais estáveis foram previstos para PQN com β -CD e 18C6 (Elbashir et al., 2010). O segundo trabalho focou na separação do PQN e quinocida em comprimidos, utilizando o mesmo BGE otimizado anteriormente (Elbashir et al., 2009b). Após avaliar os efeitos de pH, tampão, concentrações dos seletores quirais, temperatura, voltagem e injeção, o método desenvolvido foi validado e aplicado para determinar a impureza em comprimidos contendo PQN. Os resultados indicaram que as amostras continham baixos níveis de quinocida, em conformidade com a legislação (Elbashir et al., 2009b). Todos esses métodos são exemplos da capacidade da CE para determinar impurezas e separar o ingrediente farmacêutico ativo em comprimidos.

Por fim, Németh et al. (2011) desenvolveram uma abordagem de triagem com CD derivadas neutras e aniônicas utilizando a CZE-UV para separar os enantiômeros de PQN, cloroquina, mefloquina e tafenoquina. O intervalo de concentração dos seletores quirais variou de 0,2 a 20 mmol L⁻¹, e as CDs utilizadas foram as três naturais, α -CD, β -CD e γ -CD, seguidas pelas CD derivadas, que podem ser observados na Tabela 1. O tipo e a concentração de CD foram responsáveis pela resolução quiral e mobilidade dos analitos, por exemplo, nenhuma enantioseparação foi observada em concentrações baixas de CD. Um pH igual ou inferior a 3,0 foi escolhido devido ao comportamento catiônico dos analitos e à mobilidade muito lenta do fluxo eletrosmótico, o que evitou a adsorção desses compostos básicos à parede interna do capilar. A carboxymethyl- α -CD (CM- α -CD), em pH 3,0, resultou em boa resolução e seletividade para a PQN. Todas as enantioseparações foram realizadas em menos de 10 minutos (Németh et al., 2011).

Até o momento, não foram encontrados registros na literatura relatos evocando o uso da injeção pelo *outlet*, ou seja, quando o comprimento efetivo do capilar é reduzido, e por injeção múltipla para a determinação de PQN por CZE-UV em formulações farmacêuticas.

Tabela 1 - Métodos analíticos para a separação enantiomérica de primaquina por Eletroforese Capilar, em ordem cronológica.

Analito	Amostra	Técnica	Condições instrumentais	LQ e LD	Referência
PQN e cloroquina	Padrão	CE-UV	BGE: Tampão fosfato (20 mmol L ⁻¹ , pH 4,0) e 9% m/v ácido colomínico Capilar: <i>polybrenel</i> /ácido colomínico duplamente revestido, 50 cm x 50 µm d. i. (37,5 cm efetivo) Injeção: 0,5 kg/cm ² por 0,5 - 4,0 s Voltagem: +8 kV Temperatura: 16 °C Deteção: 259 nm (PQN)	n. m.	Du et al., 2002a
PQN e cloroquina	Padrão	CE-UV	BGE: Tampão fosfato (20 mmol L ⁻¹ , pH 2,9) e 3% m/v sulfato de condroitina C Capilar: <i>polybrenel</i> / sulfato de condroitina C duplamente revestido, 80 cm x 50 µm d. i. (67,5 cm efetivo) Injeção: 0,5 kg/cm ² por 0,5 - 4,0 s Voltagem: +20 kV Temperatura: 20 °C Deteção: 259 nm (PQN)	n. m.	Du et al., 2002b
PQN	Padrão	MEKC-UV	BGE: Tampão fosfato (40 mmol L ⁻¹ , pH 9,0), 30 mmol L ⁻¹ SDS, 15 mmol L ⁻¹ mono-3-O-fenilcarbamoil-β-CD, 5% MeOH Capilar: sílica fundida 60 cm x 75 µm d. i. (50 cm efetivo) Injeção: 15 kV por 5 s Voltagem: +15 kV Temperatura: 25°C Deteção: 214 nm	n. m.	Zhang et al., 2002
PQN	Comprimidos	CE-UV	BGE: Solução Tris-Fosfato (50 mmol L ⁻¹ , pH 2,5), 15 mmol L ⁻¹ HP-γ-CD Capilar: sílica fundida sem revestimento 60 cm x 50 µm d. i. (52,5 cm efetivo) Injeção: hidrostática, 6 s Voltagem: +15 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 254 nm	LQ: 0,05 mg/mL para ambos LD: 0,02 mg/mL (PQ1), 0,03 mg/mL (PQ2)	Elbashir et al., 2008
PQN e quinocida	Comprimidos	CZE-UV	BGE: Solução Tris-Fosfato (50 mmol L ⁻¹ , pH 3,0), 15 mmol L ⁻¹ HP-γ-CD Capilar: sílica fundida sem revestimento 35 cm x 50 µm d. i. (27,5 cm efetivo) Injeção: hidrostática, 10 s Voltagem: +16 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 254 nm	LQ: 4,5 ug/mL LD: 3,0 ug/mL	Elbashir et al., 2009a
PQN e quinocida	Comprimidos	CZE-UV	BGE: Ácido fosfórico (50 mmol L ⁻¹ , pH 3,0), 15 mmol L ⁻¹ β-CD ou 45 mmol L ⁻¹ 18C6 Capilar: sílica fundida sem revestimento 35 cm x 50 µm d. i. (27,5 cm efetivo) Injeção: hidrostática, 25 s Voltagem: +15 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 254 nm	LQ: 1,57 ug/L LD: 0,83 ug/L	Elbashir et al., 2009b

PQN e quinocida	Padrão	CZE-UV	<p>BGE: Ácido fosfórico (50 mmol L⁻¹, pH 3,0), 15 mmol L⁻¹ β-CD ou 45 mmol L⁻¹ 18C6 Capilar: sílica fundida sem revestimento 35 cm x 50 μm d. i. (27,5 cm efetivo) Injeção: hidrostática, 10 s Voltagem: +15 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 254 nm</p> <p>BGE: Tampão Fosfato (50 mmol L⁻¹, com pH 3,0 quando CM-α-CD, CM-β-CD e CM-γ-CD ou pH 2,5 para as demais) com diferentes CD: α-CD, β-CD, γ-CD, DIMEB, TRIMEB, RAMEB, HP-α-CD, HP-β-CD, HP-γ-CD, succinil-β-CD, CM-α-CD, CM-β-CD, CM-γ-CD, CE-α-CD, CE-β-CD, CE-γ-CD, SBE-α-CD, SBE-β-CD, SBE-γ-CD, SU-α-CD, SU-β-CD, SU-γ-CD Capilar: sílica fundida 33,5 cm x 50 μm d. i. (25 cm efetivo) Injeção: 5 x 10³ Pa por 3 s Voltagem: +20 kV ou -15 kV na presença de 20 mmol L⁻¹ de derivados de CD aniônicos Temperatura: 20 °C Deteção: 220 nm</p>	n.m.	Elbashir et al., 2010
PQN, mefloquine, cloroquina e tafenoquina	Padrão	CZE-UV	<p>BGE: Ácido fosfórico (50 mmol L⁻¹, pH 3,0), 15 mmol L⁻¹ β-CD ou 45 mmol L⁻¹ 18C6 Capilar: sílica fundida sem revestimento 35 cm x 50 μm d. i. (27,5 cm efetivo) Injeção: hidrostática, 10 s Voltagem: +15 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 254 nm</p> <p>BGE: Tampão Fosfato (50 mmol L⁻¹, com pH 3,0 quando CM-α-CD, CM-β-CD e CM-γ-CD ou pH 2,5 para as demais) com diferentes CD: α-CD, β-CD, γ-CD, DIMEB, TRIMEB, RAMEB, HP-α-CD, HP-β-CD, HP-γ-CD, succinil-β-CD, CM-α-CD, CM-β-CD, CM-γ-CD, CE-α-CD, CE-β-CD, CE-γ-CD, SBE-α-CD, SBE-β-CD, SBE-γ-CD, SU-α-CD, SU-β-CD, SU-γ-CD Capilar: sílica fundida 33,5 cm x 50 μm d. i. (25 cm efetivo) Injeção: 5 x 10³ Pa por 3 s Voltagem: +20 kV ou -15 kV na presença de 20 mmol L⁻¹ de derivados de CD aniônicos Temperatura: 20 °C Deteção: 220 nm</p>	n. m.	Nemeth et al., 2011

18C6: éter 18-coroa-6; BGE: *background electrolyte*; CD: ciclodextrina; CE: *capillary electrophoresis*; CE-α-CD: carboxietil-α-CD; CE-β-CD: carboxietil-β-CD; CE-γ-CD: carboxietil-γ-CD; CM-α-CD: carboximetil-α-CD; CM-β-CD: carboximetil-β-CD; CM-γ-CD: carboximetil-γ-CD; CZE: *capillary zone electrophoresis*; DIMEB: *dimethylated-β-CD*; HP-α-CD: hidroxipropil-α-CD; HP-β-CD: hidroxipropil-β-CD; HP-γ-CD: hidroxipropil-γ-CD; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; MEKC: *micellar electrokinetic chromatography*; MeOH: metanol; n. m.: não mencionado; PQN: primaquina; SBE-α-CD: sulfobutil-α-CD; SBE-β-CD: sulfobutil-β-CD; SBE-γ-CD: sulfobutil-γ-CD; SDS: *sodium dodecyl sulfate*; SU-α-CD: sulfatada-α-CD; SU-β-CD: sulfatada-β-CD; SU-γ-CD: sulfatada-γ-CD; TRIMEB: heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)-β-CD; UV: ultravioleta.

1.5.2 Artemeter e Lumefantrina

Para o ATM, as Farmacopeias Brasileira e Internacional indicam um método cromatográfico para a determinação em comprimidos e em solução injetável, usando uma mistura de acetonitrila e água (62:38 v/v) como fase móvel e detecção em 216 nm (World Health Organization, 2024; Brasil, 2024c). Para a LUM, não há relatos na Farmacopeia Brasileira. A Farmacopeia Internacional recomenda um método volumétrico, a titulação em meio não-aquoso com ácido perclórico para o doseamento em comprimidos (World Health Organization, 2024).

Na Farmacopeia Internacional é relatado um método cromatográfico, utilizando a HPLC para o doseamento simultâneo de ATM e LUM em comprimidos, utilizando uma eluição em gradiente. Utilizando uma coluna C18 (15 cm x 3,9 mm), a fase móvel A consiste em uma mistura de 70% do reagente par iônico e 30% de ACN, enquanto que a fase móvel B é uma mistura de 30% do reagente par iônico e 70% de ACN. O reagente par iônico é formado por uma mistura 1-hexanosulfonato de sódio e de di-hidrogenofosfato de sódio (pH 2,3). A análise é conduzida em cinco etapas, com volume de injeção de 20 µL, e com detecção em 210 nm até 28 minutos e depois é trocada para 380 nm. Nesse sistema, o ATM possui um tempo de eluição de 19 minutos e a LUM elui com 34 minutos (World Health Organization, 2024).

Todos esses procedimentos descritos nas farmacopeias utilizam grandes quantidades de reagentes orgânicos e de volumes de amostra, fatores que são prejudiciais ao meio ambiente.

Há apenas um relato que descreve uma investigação sobre o uso de técnicas de eletromigração para análise da associação de ATM e LUM em formulações farmacêuticas. Amin et al. (2013) desenvolveram um método por Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão (MEEKC, do inglês *microemulsion electrokinetic chromatography*), utilizando injeção pelo *outlet*, para a determinação de ATM e LUM em comprimidos 2-FDC (Amin et al., 2013b). Os dois analitos foram extraídos do comprimido através de metanol acidificado com ácido fosfórico, seguido da diluição do extrato na microemulsão antes da injeção para evitar distúrbios na linha de base. Após otimização das condições de separação, a pirimetamina foi selecionada como padrão interno, as análises foram realizadas em 214 nm, e o BGE consistia de uma microemulsão formada por octano, 1-butanol, SDS e tampão borato, e detecção em 214 nm. Após avaliar alguns parâmetros estatísticos, como seletividade, linearidade, recuperação, precisão, limites de detecção e quantificação, o método proposto foi aplicado a comprimidos comerciais e foi considerado adequado para analisar ATM e LUM (Amin et al., 2013b). Comparado ao método de HPLC, o método MEEKC apresenta algumas vantagens que

o tornam uma alternativa para analisar esses compostos. No entanto, a composição do BGE ainda pode ser otimizada considerando os conceitos de Química Verde.

Foi reunido, na Tabela 2, o método mencionado anteriormente por Lamalle et al. (2012) e o método descrito por Amin et al. (2013b) para a determinação de ATM e LUM utilizando a CE, nos últimos 24 anos.

Tabela 2 - Métodos de doseamento de artemeter e lumefantrina por Eletroforese Capilar, em ordem cronológica.

Analito	Amostra	Técnica	Condições Instrumentais	LQ e LD (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Ref.
PQN, ATM, artesunato, cloroquina, mefloquina, amodiaquina, piperquina, sulfadoxina, pirimetamina, quinine, halofantrine, cinchonine, sulfalen, atovaquone, proguanil	Padrão e comprimido	MEKC-UV	BGE: Tampão fostato (10 mmol L ⁻¹ , pH 6,6), 29 mmol L ⁻¹ SDS, 36% ACN Capilar: sílica fundida sem revestimento, 48,5 cm x 50 µm d.i. (40 cm efetivo) Injeção: 50 mbar x 5 s Voltagem: +20 kV Temperatura: 29 °C Deteção: 210 nm	n. m.	89,0-97,6%	Lamalle et al., 2012
ATM, LUM	Comprimido	MEEKC-UV	BGE: 0,81% m/m octano, 6,61% m/m 1-butanol, 3,31% m/m SDS, 89,27% m/m tampão borato (10 mmol L ⁻¹) Capilar: sílica fundida sem revestimento 30 cm x 50 µm d.i. (10 cm efetivo) Injeção: 0,2 psi x 5 s Voltagem: -15 kV Temperatura: 25 °C Deteção: 214 nm	LQ: 548 (ATM), 6 (LUM) LD: 164 (ATM), 3 (LUM)	99 - 101%	Amin et al., 2013b

ACN: acetonitrila; ATM: artemeter; BGE: *background electrolyte*; LD: limite de deteção; LQ: limite de quantificação; LUM: lumefantrina; MEEKC: *microemulsion electrokinetic chromatography*; MEKC: *micellar electrokinetic chromatography*; n. m.: não mencionado; PQN: primaquina; SDS: *sodium dodecyl sulfate*; UV: ultravioleta.

1.6 ELETROFORESE CAPILAR

A CE 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 capilares de sílica fundida preenchidos com solução eletrolítica e ocorre em função da diferença de mobilidade eletroforética entre os compostos.

Assim como outras técnicas clássicas de separação, a CE oferece alta eficiência, precisão, seletividade e versatilidade. Além disso, geralmente permite análises de curta duração, até mesmo com possibilidades abaixo de um minuto, sem comprometer a resolução e a seletividade, o que aumenta a frequência analítica. É uma técnica de baixo custo, uma vez que possui consumo em escala micro/nano de solventes e reagentes, e também menores volumes de amostras são introduzidos, o que se relaciona com os princípios da Química Verde. Entretanto, uma grande vantagem está na possibilidade de análise simultânea de cátions e ânions em uma mesma análise (Moreira et al., 2023; Spudeit et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Baker, 1995).

1.6.1 Instrumentação

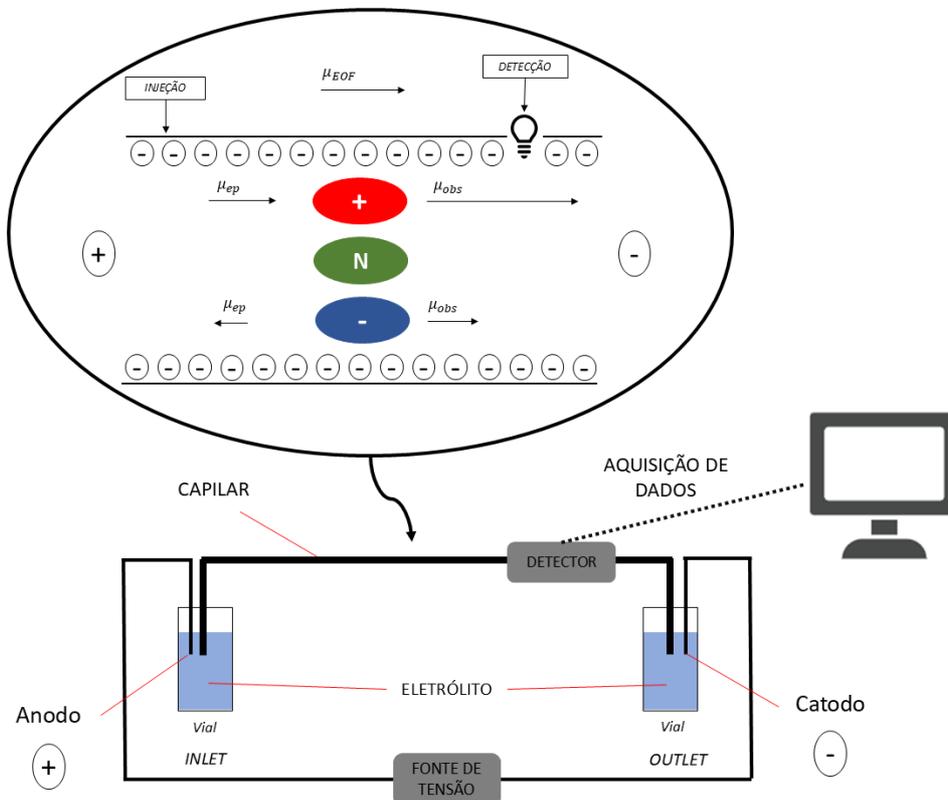
O sistema de CE é formado por uma fonte de alta tensão, tubos capilares de teflon ou de sílica fundida (revestidos externamente com poli(imida), teflon ou poli(acrilato)), eletrodos (geralmente de platina), reservatórios (*vials*) para as soluções e um detector adequado ao tipo de análise que se deseja realizar. Uma representação esquemática do sistema de CE pode ser observada na Figura 5.

A fonte de alta tensão é responsável por estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, a partir da conexão com os eletrodos que ficam imersos nos dois reservatórios contendo o eletrólito. O capilar é preenchido com a solução de eletrólito, atuando como um canal de migração, e suas extremidades também são imersas nos reservatórios com solução de eletrólito para completar o contato elétrico. Além disso, o capilar é mantido dentro de um cartucho sob temperatura constante, para minimizar os efeitos térmicos (Tavares, 1996; Baker, 1995).

A alta resistência elétrica do capilar também permite campos elétricos elevados, pois gera um aquecimento mínimo, promovendo separações com alta eficiência e tempos de análise curtos. O uso de tubos com dimensões capilares possibilita a dissipação do efeito Joule, que é a geração de calor causado pela passagem de corrente elétrica (Spudeit et al., 2012; Queiroz, Jardim, 2001). A combinação do uso de tubos capilares com diâmetro interno reduzido e

aplicação de altas voltagens, resulta em um aumento de eficiência e resolução, diminuindo o tempo de análise (Spudeit et al., 2012).

Figura 5 - Representação esquemática de um sistema de Eletroforese Capilar.



Fonte: Adaptado de Souza et al. (2024).

1.6.2 Princípios de separação

As separações em CE ocorrem, com ou sem a presença do fluxo eletroosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*), em função da diferença de mobilidade eletroforética. O EOF é resultante da interação entre o eletrólito e a superfície do capilar, gerando um movimento ordenado da solução sob a influência de um campo elétrico. Compostos com carga positiva migram em direção ao eletrodo de carga negativa (cátodo), enquanto que os compostos com carga negativa migram em direção ao eletrodo de carga positiva (ânodo) (Baker, 1995).

Ao entrar em contato com a solução de eletrólito, a superfície interna do capilar adquire carga através da ionização ou da adsorção. Nos capilares sem revestimento interno, os grupos silanóis (Si-OH) da sílica fundida são ionizados a grupos silanoatos (Si-O⁻) em soluções com pH maior que 3,0, e a superfície interna do capilar se torna negativamente carregada. Ao preencher

o capilar com uma solução de eletrólito, os cátions dessa solução são atraídos para a superfície do capilar, formando uma camada interna, denominada camada fixa. Entretanto, essa camada não possui cargas positivas suficientes para neutralizar as cargas negativas e assim uma segunda camada de cátions é formada, denominada camada móvel. As camadas fixa e móvel formam a dupla camada elétrica. Após o preenchimento do capilar com a solução de eletrólito, é aplicada uma diferença de potencial nas extremidades do capilar e um campo elétrico é estabelecido tangencialmente à superfície. Dessa forma, ocorre um movimento unilateral dos cátions presentes na camada móvel em direção ao eletrodo de carga negativa (catodo). Uma vez que os cátions são solvatados, há o arraste do eletrólito com eles, causando o EOF. É importante que o EOF seja constante, pois influencia diretamente no tempo de migração dos compostos e na área dos picos. Para isso, algumas propriedades da solução eletrolítica devem ser avaliadas, como o pH, concentração e força iônica da solução tampão, o aditivo orgânico, viscosidade e temperatura (Tavares, 1996; Baker, 1995).

Em condições normais, o EOF ocorre em direção ao eletrodo de carga negativa. O EOF geralmente é maior do que as mobilidades eletroforéticas dos compostos negativamente carregados e estes são deslocados em direção ao detector, migrando com velocidade menor do que o EOF. Compostos neutros não são influenciados pela mobilidade eletroforética e migram na mesma velocidade que o EOF. Compostos positivamente carregados sofrem influência de suas mobilidades intrínsecas e do EOF, migrando com velocidade maior do que o EOF. A velocidade de migração dos íons é dependente da relação carga/raio de cada composto, ou seja, um íon com raio menor irá migrar mais rápido do que um íon com raio maior, mas mesma carga (Baker, 1995).

Na formação da dupla camada elétrica, a distribuição dos íons ocorre de forma não homogênea e gera um gradiente de velocidade, denominado por velocidade eletrosmótica (v_{eo}). A velocidade eletrosmótica é dada pela Equação 1, em cm s^{-1} :

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

onde μ_{eo} é a mobilidade eletrosmótica ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) e E é o campo elétrico (em V cm^{-1}).

Uma forma de mensurar o EOF em CE de solução livre é através da injeção de um composto sem carga, ou seja, um marcador neutro. Existem diversos marcadores neutros, como o metanol, fenol, acetona, benzeno ou piridina (Baker, 1995). A mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}) pode ser então determinada experimentalmente, definindo-se as dimensões do capilar e voltagem aplicada, de acordo com a Equação 2, em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$:

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

onde L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar (em cm), L_{tot} é o comprimento total do capilar (em cm), t_{eo} é o tempo de migração do composto neutro (em min) e V é a voltagem aplicada (em V).

Sob influência de um campo elétrico, um composto carregado irá migrar através da solução de eletrólito com uma velocidade eletroforética (v_{ep}), dada pela Equação 3, em cm s^{-1} :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (3)$$

onde μ_{ep} é a mobilidade eletroforética ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) e E é o campo elétrico (em V cm^{-1}).

Para íons esféricos a mobilidade eletroforética (μ_{ep}) é intrínseca do analito e corresponde a sua velocidade em um campo elétrico unitário, conforme Equação 4, em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (4)$$

onde v_{ep} é a velocidade eletroforética (em cm s^{-1}), E é o campo elétrico (em V cm^{-1}), q é a carga do analito (em C), η é a viscosidade da solução de eletrólito (N s m^{-2}) e r_i é o raio hidrodinâmico (em pm).

Pela Equação 4, é possível inferir que quando maior for a razão carga/raio $\left(\frac{q}{r_i}\right)$, maior será a mobilidade eletroforética e, conseqüentemente, maior será a velocidade do composto. Compostos pequenos e com cargas altas tendem a migrar através do capilar mais rapidamente, enquanto que compostos grandes e com cargas menores migram mais lentamente. Os compostos neutros possuem mobilidade eletroforética igual a zero pois o valor de q na Equação 4 é zero (Baker, 1995).

A mobilidade observada do composto (μ_{obs}) é dependente da sua mobilidade eletroforética (μ_{ep}) e da mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), conforme Equação 5:

$$\mu_{obs} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (5)$$

onde μ_{ep} é a mobilidade eletroforética ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) e μ_{eo} é a mobilidade eletroosmótica ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Da mesma forma que a mobilidade eletroosmótica (μ_{eo}), a mobilidade observada (μ_{obs}) pode ser calculada experimentalmente através da injeção de uma solução contendo o analito, definindo-se as dimensões do capilar e da voltagem aplicada, conforme Equação 6, em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$:

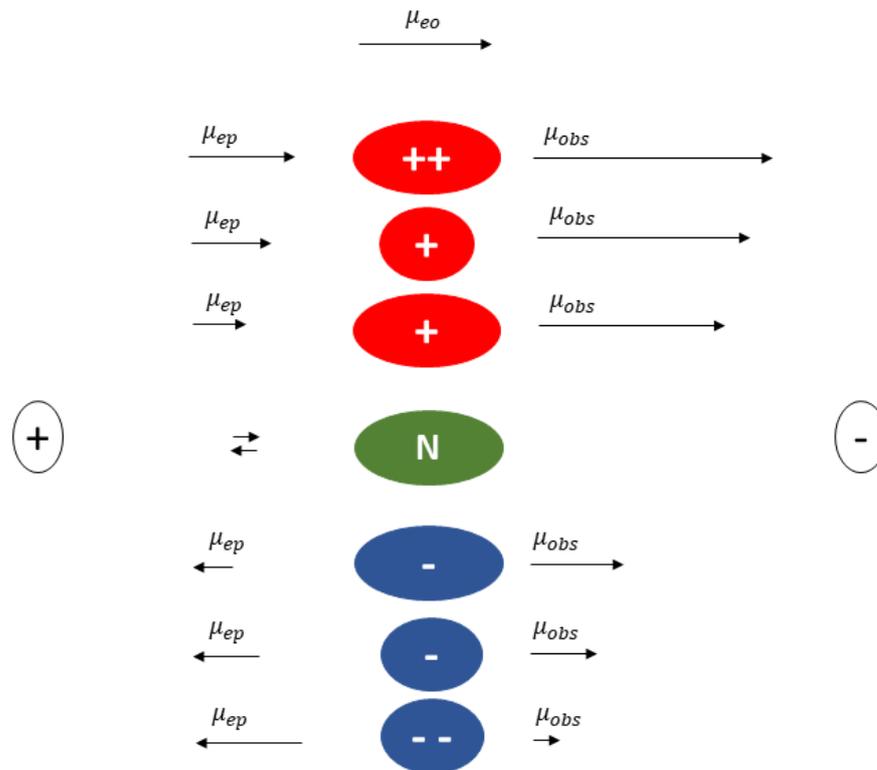
$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef}L_{tot}}{t_m V} \quad (6)$$

onde L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar (em cm), L_{tot} é o comprimento total do capilar (em cm), t_m é o tempo de migração do composto (em min) e V é a voltagem aplicada (em V).

Nesse contexto, é possível calcular o valor da mobilidade eletroforética (μ_{ep}) através da Equação 5, uma vez que as mobilidades eletroosmótica (μ_{eo}) e observada (μ_{obs}) são facilmente calculados experimentalmente pelas Equações 2 e 6, respectivamente.

A velocidade e o sentido de migração dependem da relação carga-raio e da magnitude das μ_{eo} e μ_{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: Elaborada pela autora (2024).

O conceito de mobilidade efetiva (μ_{ef}) descreve a migração de eletrólitos fracos, que existem sob duas formas químicas em equilíbrio: a forma ionizada (com mobilidade diferente de zero) e a forma não-ionizada (com mobilidade zero). A mobilidade efetiva pode ser calculada pela definição de Tiselius que considera que qualquer ácido (i) presente em solução em diferentes espécies (j), relacionadas através de um equilíbrio ácido-base, irá migrar em um campo elétrico como um único soluto, possuindo mobilidade efetiva dada pela Equação 7, em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Tavares, 1996):

$$(\mu_{ef})_i = \sum_j (\alpha_{j,i} \mu_{j,i}) \quad (7)$$

onde i representa um ácido qualquer, j representa as diferentes espécies do ácido i, $\alpha_{j,i}$ é a fração de distribuição ou grau de ionização de cada forma j, e $\mu_{j,i}$ é a mobilidade eletroforética de cada espécie j ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Dessa forma, a mobilidade efetiva de um ácido i está relacionada à fração molar de cada espécie j deste ácido, bem como com a sua mobilidade eletroforética. Sabe-se que fração de distribuição pode ser definida pela constante de dissociação do analito, pK_a , o que mostra uma dependência indireta entre a mobilidade eletroforética e o pH do meio, ou seja, com a composição o eletrólito. A curva de mobilidade efetiva *versus* pH (μ_{ep} x pH), é um excelente indicador da condição de pH mais favorável para ocorrer uma separação (Tavares, 1996).

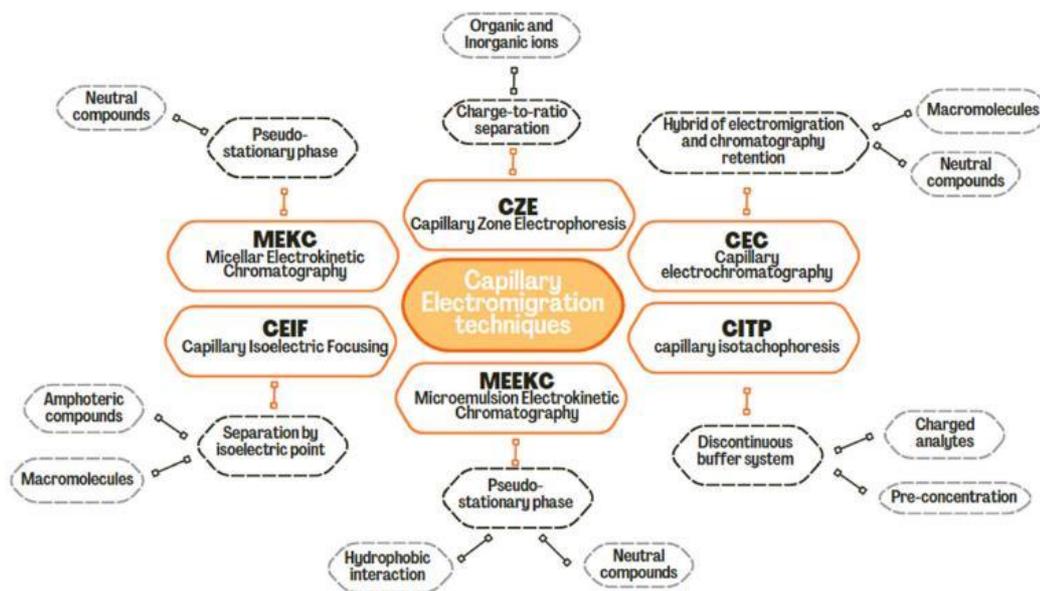
Experimentalmente, a mobilidade efetiva pode ser calculada através de uma análise realizada sob determinadas condições experimentais, para cada analito. Os dados importantes para o cálculo são os tempos de migração dos analitos e do EOF, além da voltagem aplicada e das dimensões do capilar, que são utilizados nas equações 2, 5 e 6 para os cálculos de μ_{eo} , μ_{ep} e μ_{obs} , respectivamente.

1.6.3 Modos de separação

A versatilidade da CE é de grande relevância devido a disponibilidade de diferentes modos de separação, como a CZE, a MEKC, a MEEKC, a eletroforese capilar em gel, a focalização isoelétrica capilar e a isotacoforese capilar (Baker, 1995). Na Figura 7 podem ser observados os modos de separação em eletroforese capilar e suas principais características.

A CZE é o modo de separação mais utilizado. Apesar da sua aplicabilidade em separações de cátions e ânions na mesma corrida, não é adequado para a separação de substâncias neutras, que migram com a mesma velocidade do EOF. Na CZE, a amostra é introduzida no capilar previamente preenchido com a solução de eletrólito, previamente 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. Uma separação eficiente dos analitos é decorrente da maximização das diferenças entre as mobilidades eletroforéticas e na minimização das causas de alargamento de zona (Tavares, 1997; Baker, 1995).

Figura 7 - Modos de separação em Eletroforese Capilar e suas características.



Fonte: Moreira et al. 2023.

O princípio de separação na MEKC é baseado na partição diferencial dos analitos entre a fase aquosa e uma fase micelar, também chamada de fase pseudoestacionária micelar. A fase pseudoestacionária é formada por um surfactante adicionado à solução de eletrólito, com concentração acima da sua concentração micelar crítica, e quanto maior a fração do analito que interage com a micela, mais lenta será sua migração (Hancu et al., 2013).

Entretanto, compostos que são apolares e lipofílicos tendem a não ser bem resolvidos pela MEKC e para contornar esse problema, Watari (1991) introduziu as microemulsões nas separações por CE, originando a MEEKC (Buchberger, 2016). A separação nessa técnica se baseia na interação diferencial dos analitos entre a fase aquosa e uma fase pseudoestacionária, que é composta por uma microemulsão. A microemulsão é um sistema termodinamicamente estável formada por uma fase aquosa e uma fase oleosa, que são estabilizadas pela adição de um surfactante e um co-surfactante. Com base em sua microestrutura, as microemulsões podem ser divididas em dois grupos: óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). Em uma microemulsão O/A, a mais comum e mais utilizada, as gotículas de óleo se dispersam na fase aquosa com o auxílio de surfactante e co-surfactante. A parte hidrofóbica do surfactante se reúne facilmente em direção às gotículas de óleo e a parte hidrofílica se ligam à fase aquosa, enquanto o co-surfactante é responsável por ajustar o equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico do surfactante, reduzindo a tensão superficial entre as fases. Para a microemulsão A/O, a gota de água se posiciona dentro das micelas invertidas resultantes (Buchberger, 2016; Ryan et al., 2013; Yang et al., 2013; Altria et al., 2003).

A separação em MEEKC é obtida não apenas pela mobilidade do analito, mas também pelos coeficientes de partição do analito entre a fase aquosa e as gotículas da microemulsão, que combinam comportamentos eletroforéticos e cromatográficos. Nesses sistemas, a presença de uma fase oleosa oferece um volume de superfície hidrofóbica maior, fazendo com que compostos altamente hidrofóbicos interajam com as gotas de óleo mais facilmente do que com micela na MEKC, por que possuem a estrutura menos rígida. A MEEKC apresenta uma maior aplicabilidade pois permite a separação, simultaneamente, de compostos polares, apolares, neutros e ionizáveis (Buchberger, 2016; Ryan et al., 2013; Yang et al., 2013; Altria et al., 2003).

1.6.4 Detectores

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 (Tavares, 1996).

A detecção por UV é a mais utilizada e requer a presença de grupos cromóforos na estrutura dos analitos. Para compostos que apresentam baixa ou nenhuma absorvidade no UV, pode ser realizada a detecção indireta pelo UV ou outros detectores. Na detecção indireta por UV o eletrólito deve conter um agente cromóforo em sua composição, com alta absorvidade molar em um comprimento de onda em 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 com, 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).

Outros detectores que podem ser acoplados à CE são a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) e o detector por condutividade, em que se tem o detector de condutividade sem contato acoplado por capacitância (C⁴D, do inglês *capacitively-coupled contactless conductivity detectors*) (Silva, Lago, 1998; Zemmann et al., 1998).

1.6.5 Métodos de Injeção

As amostras podem ser injetadas no capilar através de diferentes métodos, como a injeção hidrodinâmica e a injeção eletrocínética. A injeção hidrodinâmica consiste na aplicação

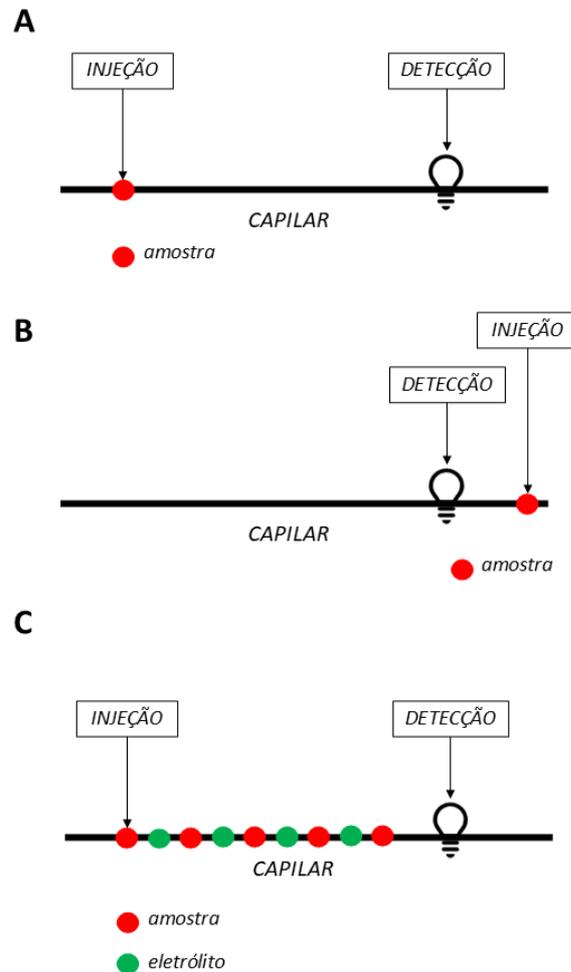
de uma diferença de pressão entre o reservatório de BGE e o da amostra, enquanto que na injeção eletrocinética a amostra é injetada através da aplicação de uma voltagem (Baker, 1995).

Uma vantagem da injeção hidrodinâmica é a possibilidade de realizar injeções individuais ou em sequência. Na injeção individual, é possível realizá-la no modo convencional ou *inlet* em que as amostras são introduzidas através da extremidade do capilar mais distante ao detector. Quando as amostras são introduzidas através da extremidade do capilar mais próxima do detector é chamado de injeção pelo *outlet*, ou por *short-end injection*. Esse modo é aplicável quando se deseja diminuir o tempo de análise, aumentando a frequência analítica. Na prática, para a aplicação da injeção pelo *outlet* é necessário colocar o reservatório da amostra na posição do *outlet*, aplicar pressão negativa no reservatório de entrada na posição do *inlet* e inverter a polaridade da voltagem, para inverter a direção da migração dos compostos (Nascimento et al., 2022; Spudeit et al., 2012; Glatz, 2013).

Na injeção sequencial, conhecida por injeção múltipla é possível analisar duas ou mais amostras injetadas sequencialmente em uma mesma corrida, com a vantagem de reduzir as variações que podem ocorrer no tempo de migração entre diferentes corridas e, portanto, nas áreas do pico. Na prática, é necessário a injeção de um BGE espaçador entre as amostras para garantir que as zonas das amostras não se misturem, proporcionando uma resolução entre os picos adequada. O tempo de injeção do BGE espaçador é um parâmetro que deve ser otimizado para promover uma melhor separação entre os picos. A injeção múltipla também possui a vantagem de reduzir o tempo de análise, além de aumentar a frequência analítica do método (Vital et al., 2025; Nascimento et al., 2022; Spudeit et al., 2012; Amini et al., 2008).

Na Figura 8 podem ser observados os esquemas de injeção para as injeções convencional, pelo *outlet* e injeção múltipla

Figura 8 - Modos de injeção de amostras em eletroforese capilar: injeção convencional, pelo lado mais distante do detector (A), injeção pelo *outlet*, ou seja, pelo lado mais próximo do detector (B), e injeção múltipla, pelo lado mais distante do detector (C).



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.7 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos é uma abordagem estatística que tem sido amplamente utilizada em estudos de otimização de sistemas com duas ou mais variáveis, onde se deseja entender a 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 (Barros Neto et al., 2010).

No caso de desenvolvimento de métodos por CE, a implementação de um planejamento de experimentos é de grande relevância, uma vez que diversos parâmetros necessitam ser

otimizados para alcançar uma adequada condição de separação. Entre os parâmetros, tem-se a composição e concentração do eletrólito, a voltagem, a temperatura, a pressão e tempo de injeção da amostra e o tamanho e diâmetro do capilar.

O planejamento fatorial é o modo mais simples de ser implementado, uma vez que é preciso escolher os fatores (k) relevantes para o sistema e em seguida definir os níveis (N) em que cada fator será estudado, ou seja, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos, resultando em k^N experimentos (Barros Neto et al., 2010).

Entretanto, ao aumentar a complexidade do sistema, pode ser inviável realizar um número alto de experimentos. Para tornar mais fácil a avaliação dos parâmetros do sistema, existem os chamados planejamentos fatorial fracionados, como por exemplo, o planejamento Box-Behnken. 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 (Ferreira et al., 2007). 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. O número de experimentos (n_{Exp}) é definido pela Equação 8. Por exemplo, para um planejamento Box-Behnken 3^3 , com triplicata no ponto central, temos que $k = 3$, $n_{PC} = 3$ e um total de 15 experimentos (Ferreira et al., 2007).

$$n_{Exp} = 2k(k - 1) + n_{PC} \quad (8)$$

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

1.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação de métodos analíticos é o processo que demonstra a adequabilidade de um método analítico para um propósito específico. O processo de validação garante que o método é confiável, reproduzível e fornece resultados precisos e consistentes para a análise de um determinado composto. Uma vez que dados analíticos não confiáveis podem levar a decisões incorretas e a prejuízos irreparáveis, é necessário garantir que o desenvolvimento de métodos analíticos seja conduzido por uma verificação de qualidade, confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade do método. A validação é, portanto, uma etapa relevante no controle de qualidade e no desenvolvimento de métodos analíticos para atender demandas industriais, acadêmicas e regulatórias (Ribani et al., 2004).

Uma das principais referências internacionais para a validação de métodos analíticos, especialmente na área farmacêutica, é o ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*). O ICH é uma organização formada através de colaborações entre agências regulatórias e indústria farmacêutica de várias regiões do mundo, especialmente os Estados Unidos, a Europa e o Japão (ICH, 2022), com a finalidade de harmonizar os requisitos para o registro de medicamentos, objetivando a eficiência e segurança global no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

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 (INMETRO, 2020; Brasil, 2017). 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, 2017). Além disso, um processo de validação deve ser considerado quando há novos desenvolvimentos de métodos, ou quando são realizadas alterações em metodologias já validadas, como inclusão de novas técnicas e uso de diferentes equipamentos (Brito et al., 2003).

Os parâmetros mais importantes para a validação de um método analítico incluem a linearidade e faixa de trabalho, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e a robustez (ICH, 2022; INMETRO, 2020; Brasil, 2017).

1.8.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade do método em identificar ou quantificar o analito, de forma inequívoca, na presença de outros componentes da matriz da amostra, como impurezas. A seletividade é considerada, geralmente, como a primeira etapa no processo de desenvolvimento e validação de um método. Há diversos processos que podem ser implementados para a avaliação da seletividade, como: comparação da matriz sem o analito com a matriz adicionada com o analito, comparação do espectro do pico do padrão com o espectro do pico do analito na amostra (obtidos por detector UV ou MS), comparação do coeficiente angular da curva analítica com adição de padrão do analito na amostra com a curva analítica somente dos padrões (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004).

1.8.2 Linearidade

A linearidade de um método é definida como a capacidade de obter resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma determinada faixa de trabalho (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004). Entretanto, a concentração de uma amostra não é uma grandeza física observável e para obtê-la é necessário realizar medidas de outras grandezas, como a absorção e condutividade. Logo, é realizado o processo de calibração, a fim de encontrar uma função relacionando as medidas feitas com a concentração do analito desejada (Pimentel, Barros Neto, 1996).

O processo de calibração é dividido nas etapas descritiva e preditiva. Na etapa descritiva, são realizadas medições de uma série de soluções padrões com concentrações conhecidas para obter um modelo matemático que relacione a grandeza medida com a concentração do analito. Em seguida, na etapa preditiva, o modelo matemático construído é utilizado para prever as concentrações de outras amostras, considerando os seus respectivos sinais analíticos (Pimentel, Barros Neto, 1996).

Recomenda-se que a linearidade seja estabelecida com a utilização de, no mínimo, cinco níveis de concentração diferentes, em triplicata (Brasil, 2017). O modelo matemático que relaciona o sinal medido com a concentração do analito, muitas vezes é expresso como uma curva analítica. A curva de calibração é a representação gráfica dos sinais analíticos medidos pelo instrumento (y) em função da concentração do analito (x), que mostra uma relação linear, conforme Equação 9 (Ribani et al., 2004; Pimentel, Barros Neto, 1996):

$$y = a \cdot x + b \quad (9)$$

onde a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear, y é a variável dependente e x é a variável independente.

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. Uma curva analítica bem ajustada é evidenciada pela obtenção de um r próximo de 1,0, mostrando uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais. Além disso, a relação linear descrita pela Equação 9 só é válida em uma determinada faixa de trabalho, que corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior do analito, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (Ribani et al.,

2004). Para a ANVISA, a faixa de trabalho deve ser entre 80% a 120% nos métodos para determinação do teor de fármacos (Brasil, 2017).

O método dos mínimos quadrados é um modelo de regressão mais utilizado para realizar o ajuste do modelo matemático aos dados coletados pois minimiza a soma dos quadrados das diferenças entre os valores observados e previstos, que são chamados de resíduos. A implementação do método dos mínimos quadrados para tratamento estatístico dos resultados exige que alguns pressupostos relacionados a natureza dos erros associados às medidas sejam satisfeitos (Pimentel, Barros Neto, 1996).

O primeiro pressuposto diz que os erros nas medidas ocorrem devido a flutuações na variável dependente (y), neste caso, o sinal analítico. Essa hipótese é satisfeita quando as soluções padrões são adequadamente preparados para a calibração, visando minimizar e evitar possíveis erros adicionais ao processo. O segundo pressuposto diz que a variância dos erros deve ser constante ao longo de diferentes níveis de uma variável independente, e também é chamado de homoscedasticidade. Essa hipótese é satisfeita quando são realizadas determinações repetidas autênticas de uma mesma solução padrão ou amostra, ou seja, cada análise é feita a partir de uma solução preparada independentemente, seguida da avaliação através de testes estatísticos, como o teste F.

O terceiro pressuposto diz que os erros não são correlacionados, ou seja, são independentes. Essa hipótese é satisfeita quando as soluções padrões são preparadas separadamente e de forma semelhante em cada nível de concentração, além de realizar a análise de forma aleatória. Por fim, o quarto pressuposto diz que os erros devem seguir uma distribuição normal. Essa hipótese pode ser verificada pelo teste de Shapiro-Wilk (Pimentel, Barros Neto, 1996).

Apesar da relevância do coeficiente de correlação (r), somente a sua avaliação não é suficiente para a obter a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada, sendo necessário a realização da Análise de Variância, com testes de falta de ajuste e de significância da regressão (Pimentel, Barros Neto, 1996) A Tabela 3 reúne os elementos necessários para a implementação da Análise de Variância.

Tabela 3 - 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 ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de medidas; p = número de parâmetros do modelo; 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 ; G.L. são os graus de liberdade.

Fonte: (Pimentel, Barros Neto, 1996).

São estabelecidas duas hipóteses:

- hipótese nula: a equação da reta é adequada para descrever os dados coletados;
- hipótese alternativa: a equação da reta não é adequada para descrever os dados coletados.

Em seguida, são realizados os testes de falta de ajuste e o teste de significância da regressão. O primeiro teste, representado pela Equação 10, verifica se existe uma relação linear dentro de cada nível de concentração. O segundo teste, representado pela Equação 11, verifica a existência de uma relação linear significativa entre as variáveis x e y (Pimentel, Barros Neto, 1996).

$$F_{cal} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad (10)$$

$$F_{cal} = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} \quad (11)$$

onde F_{cal} é o valor de F calculado, MQ_{faj} é a média quadrática da falta de ajuste; MQ_{ep} é a média quadrática dos erros puros, MQ_{reg} é a média quadrática da regressão, e MQ_{res} é a média quadrática dos resíduos.

Para que a hipótese nula não seja rejeitada, indicando que o modelo matemático construído pode ser utilizado para a quantificação da amostra, no teste de falta de ajuste o valor de F_{cal} deve ser menor que o F_{tab} e no teste de significância da regressão o valor de F_{cal} deve ser pelo menos cinco vezes maior do que o F_{tab} . Esses resultados indicam que não há evidências de falta de ajuste do modelo e que existe uma relação linear significativa entre as variáveis x e y (Pimentel, Barros Neto, 1996).

1.8.3 Precisão

A precisão de um método é definida como a capacidade em avaliar a dispersão dos resultados obtidos entre as análises independentes e repetidas de uma amostra, de amostras semelhantes ou de soluções padrões (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004). É avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), conforme a Equação 12:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (12)$$

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

A precisão pode ser expressa pela repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetibilidade, ou precisão intra-corridas, é definida pela concordância entre os resultados de medidas sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições de medição, que podem ser o mesmo analista, mesmo procedimento, mesmo instrumento ou em um pequeno intervalo de tempo. 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. A precisão intermediária é definida pela proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, dentro do mesmo laboratório devido, mas condições diferentes, como diferentes dias, analistas ou

equipamentos, ou até uma combinação destes fatores. O número de determinações necessárias para avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação feita para a repetitividade. A reprodutibilidade é definida como a proximidade dos resultados obtidos da análise realizada em laboratórios diferentes, ou seja, com diferentes analistas, equipamentos e laboratórios. É aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004).

1.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como o grau de concordância entre os resultados individuais do método proposto em relação a um valor de referência. 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, por ensaios de recuperação e por adição de padrão (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004).

No processo de recuperação é avaliada a proporção da quantidade do analito, presente ou adicionado na amostra, que é extraída e passível de ser quantificada. Também chamado de fortificação, o procedimento de recuperação consiste na adição do padrão do analito em uma concentração conhecida à amostra. A recuperação é expressa pela relação percentual da quantidade medida do analito com a quantidade do padrão do analito adicionado à amostra, de acordo com a Equação 13 (Ribani et al., 2004). A ANVISA recomenda a utilização de, no mínimo, nove determinações contemplando três níveis de concentração em triplicata e preparadas de forma independente (Brasil, 2017).

$$R \% = \frac{A_{A+P} + A_A}{A_P} \cdot 100 \quad (13)$$

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.

1.8.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser determinado pela relação sinal/ruído, pelo método visual ou pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica. A relação sinal/ruído é

determinada comparando os sinais medidos a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito com um branco (matriz isenta do analito) (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004).

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada, sob condições experimentais estabelecidas. O LQ pode ser determinado pelos mesmos métodos que o LD (Brasil, 2017; Ribani et al., 2004).

As Equações 14 e 15 expressam os valores de LD e LQ em função da relação sinal/ruído.

$$LD = \frac{3 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{MÁX} - H_{MÍN}} \quad (14)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s_b \cdot C_A}{H_{MÁX} - H_{MÍN}} \quad (15)$$

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.

2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos referentes ao trabalho desenvolvido.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos por Eletroforese Capilar para a determinação de primaquina, artemeter e lumefantrina em formulações farmacêuticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◇ Desenvolver e otimizar um método analítico por Eletroforese Capilar de Zona com detecção por UV utilizando injeção pelo *outlet* para determinação de primaquina em comprimidos;
- ◇ Desenvolver e otimizar um método analítico por Eletroforese Capilar de Zona com detecção por UV utilizando injeção múltipla para determinação de primaquina em comprimidos;
- ◇ Realizar o estudo de degradação forçada da primaquina utilizando o método desenvolvido por Eletroforese Capilar de Zona com detecção por UV utilizando injeção pelo *outlet*;
- ◇ Utilizar a Quimiometria através de planejamentos de experimentos para a otimização das condições instrumentais e do eletrólito de corrida dos métodos para determinação da primaquina;
- ◇ Avaliar figuras de mérito para a validação do método proposto;
- ◇ Desenvolver e otimizar um método analítico por Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão com detecção por UV para determinação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os reagentes, as soluções, os métodos e os instrumentos 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 pelo sistema de osmose reversa (Quimis – Diadema, Brasil).

Tris (Hidroximetil) Amino Metano P.A. (Tris), ácido acético P.A. Glacial (HAc), ácido clorídrico P.A. (HCl), dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da VETEC (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Álcool etílico P.A. (EtOH) foi adquirido na Sciavicco (Arraial Velho, Sabará, Minas Gerais, Brasil). Álcool metílico P.A. (MeOH) foi adquirido na Synth (Diadema, São Paulo, Brasil) e na CRQ Produtos Químicos (Diadema, São Paulo, Brasil). Álcool isopropílico P.A. foi adquirido na Purion Química (Paulínia, SP, Brasil). Acetonitrila P.A./A.C.S. (ACN) e hidróxido de sódio P.A. (NaOH) foram adquiridos na Neon (Suzano, São Paulo, Brasil). Hexano P.A./A.C.S. foi adquirido da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Tetraborato de sódio decahidratado (TBS) e 1-butanol anidro foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Diclorometano P.A. (DCM) foi adquirido na Alphatec (Macaé, Rio de Janeiro, Brasil). O detergente Extran® MA 02 neutro foi adquirido na Merck S.A. (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

Primaquina Substância Química de Referência (Farmacopeia Brasileira, Fiocruz/INCQS, lote Z2F01, CAS 90-34-6), padrão de lumefantrina (ACROS ORGANICS, lote A0374685, CAS 82186-77-4) e padrão de artemeter (ACROS ORGANICS, lote A0413579, CAS 71963-77-4) foram adquiridos e utilizados.

Os comprimidos de 15 mg de primaquina (lote 22081045) foram fornecidos pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brasil). Os comprimidos de 120 mg de lumefantrina e 20 mg de artemeter (lote NAA8641B), fabricados pela Macleods Pharmaceuticals (Índia), foram importados e fornecidos pelo Instituto de Tecnologia de Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brasil).

Os excipientes da formulação (celulose microcristalina, lactose monoidratada "*spray dried*", estearato de magnésio, talco 325 *mesh*, croscarmelose sódica e fosfato tricálcico) foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Solução estoque padrão de primaquina foi preparada em água deionizada e estocada na geladeira até o momento das análises, na concentração de 1000 mg L^{-1} . No dia da realização das análises foram feitas as diluições adequadas. A cada semana de trabalho, uma nova solução era preparada.

Soluções estoques padrões individuais dos fármacos artemeter e lumefantrina foram preparados em diferentes solventes e estocadas na geladeira até o momento das análises, nas concentrações de 5000 mg L^{-1} para o artemeter e de 1000 mg L^{-1} para a lumefantrina. Os solventes utilizados foram etanol, metanol e diclorometano. Para o preparo da lumefantrina em etanol e metanol, foi utilizada 1% ácido acético. Durante o desenvolvimento do método, uma nova solução estoque individual de artemeter foi preparada utilizando etanol e 1% de ácido acético. No dia da realização das análises foram feitas as diluições adequadas. A cada semana de trabalho, novas soluções eram preparadas.

Solução de NaOH foi preparada na concentração de 1 mol L^{-1} para os condicionamentos do capilar inicial e entre corridas, e para o teste de degradação forçada.

Solução de HCl foi preparada na concentração de 1 mol L^{-1} para os condicionamentos do capilar entre corridas, e para o teste de degradação forçada.

Solução de H_2O_2 foi preparada na concentração de 5% v/v para o teste de degradação forçada.

Soluções de BGE Tris/HCl, em pH 2,0, foram preparadas nas concentrações de $10/20 \text{ mmol L}^{-1}$, $20/30 \text{ mmol L}^{-1}$, $30/40 \text{ mmol L}^{-1}$, em água deionizada, e estocadas na geladeira.

A solução estoque de tetraborato de sódio (TBS) foi preparada na concentração de 120 mmol L^{-1} , em água deionizada, e armazenada em temperatura ambiente ($\sim 21 \text{ }^\circ\text{C}$). No momento do preparo da microemulsão, foi realizada a diluição para a concentração de 20 mmol L^{-1} , em água deionizada.

Solução da microemulsão utilizada como BGE contendo 20 mmol L^{-1} de tampão TBS (pH 8,7), 18% v/v de ACN, 0,8% m/m de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% m/m de SDS foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL seguindo as etapas: a uma massa de 0,6 g de SDS foram adicionados 0,4 g de hexano (volume), 10,5 mL de 1-butanol e 9,0 mL de ACN. Em seguida, foram adicionados um volume de tampão TBS suficiente para completar o volume final, e estar na concentração de 20 mmol L^{-1} . A solução foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos, e em seguida, foi filtrada utilizando um filtro de seringa (membrana de PTFE hidrofílico, $25 \text{ mm} \times 0,22 \text{ } \mu\text{m}$). A solução de microemulsão foi armazenada em temperatura ambiente ($\sim 21 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Nesta seção serão apresentados os preparos de amostras de comprimidos para todos os fármacos em estudo.

3.2.1 Preparo da amostra de primaquina para o doseamento

Vinte comprimidos, contendo 15 mg de primaquina, foram pesados e pulverizados em almofariz e pistilo. Uma porção do pó dos comprimidos equivalente a 25 mg de primaquina foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 10 mL de água deionizada e a solução foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com água deionizada. A concentração teórica do fármaco nessa condição é 1000 mg L^{-1} . Antes de ser injetada, a amostra foi filtrada em filtro de seringa (membrana PTFE $0,45 \text{ }\mu\text{m}$) e foram realizadas as diluições necessárias para cada teste.

3.2.2 Preparo da amostra de primaquina para o estudo da degradação

A solução estoque padrão de PQN e os comprimidos de PQN foram submetidos a diferentes condições de estresse: alcalina, ácida, neutra e oxidativa.

Uma alíquota de $500 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque da amostra, preparada conforme descrito na seção 3.2.1, foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL. O mesmo foi feito para a solução estoque padrão do fármaco. Para as condições de hidrólise alcalina e ácida, foram adicionados, respectivamente, 2,5 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, e o volume foi completado com água deionizada. Para a hidrólise neutra, o volume foi completado com água deionizada. Para a condição oxidativa, foram adicionados $500 \text{ }\mu\text{L}$ de H_2O_2 5% v/v, e o volume foi completado com água deionizada. As soluções foram protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente por 10 horas. Após períodos específicos (2h, 4h, 6h, 8h e 10h), alíquotas de $500 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução foram retiradas, transferidas para *vials* e injetadas no equipamento de CE.

3.2.3 Preparo da amostra de artemeter e lumefantrina para o doseamento

Vinte comprimidos, contendo 120 mg de lumefantrina e 20 mg de artemeter, foram pesados e pulverizados em almofariz e pistilo. Uma porção do pó dos comprimidos equivalente

a 100 mg de artemeter foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL etanol e 100 μ L de ácido acético (1%) e a solução foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com etanol. As concentrações teóricas dos fármacos nessa condição são de 10000 mg L⁻¹ de artemeter e 60000 mg L⁻¹ de lumefantrina. Antes de ser injetada, a amostra foi filtrada em filtro de seringa (membrana de PTFE hidrofílico, 25 mm x 0,22 μ m) e foram realizadas as diluições necessárias para cada teste.

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*), configurado nos comprimentos de onda de interesse (*peak width* > 0.1 min; 2 s *response time*; 2.5 Hz), e *software* para controle, aquisição e tratamento dos dados OpenLAB CDS Chem Station Edition (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

Nos métodos otimizados para a primaquina, foi utilizado o capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (série TSP) (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) de 33,5 cm (25,0 cm de comprimento efetivo) x 50 μ m d.i. x 375 μ m d.e. A temperatura do capilar foi mantida em 25 °C e as análises foram realizadas em comprimentos de onda de 265 nm.

Para o método de injeção pelo *outlet*, a injeção da amostra foi realizada na extremidade do capilar mais próxima ao detector, pela injeção hidrodinâmica, aplicando 50 mbar por 3 s. Em seguida, o BGE também foi injetado sob as mesmas condições, e o sistema eletroforético foi mantido a uma voltagem constante de +20 kV.

Para o método de injeção múltipla as injeções foram realizadas na extremidade do capilar mais distante do detector, pela injeção hidrodinâmica, aplicando 50 mbar por 3 s para as amostras e 50 mbar por 18 s para o eletrólito espaçador. Considerando seis como o número de injeções otimizadas (ver a seção 4.2), a injeção iniciou com a amostra e finalizou com o eletrólito, sendo intercalada pelo eletrólito espaçador. O sistema eletroforético foi mantido a uma voltagem constante de +15 kV.

No teste inicial para o método de separação do artemeter e lumefantrina, a temperatura do capilar foi mantida em 25 °C, as amostras foram injetadas hidrodinamicamente 25 mbar durante 5,0 s, e o sistema de eletroforese foi operado sob polaridade normal, voltagem de +20 kV. Foi utilizado capilar de sílica fundida revestido com PTFE (série TSU) (Polymicro Technologies,

Phoenix, EUA) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo) x 75 μm d.i. x 375 μm d.e. As análises foram realizadas em comprimentos de onda de 200 nm para o artemeter e 235 nm para a lumefantrina. Durante o desenvolvimento do método o capilar foi trocado pelo capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (série TSP) (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo) x 50 μm d.i. x 375 μm d.e.

Os espectros UV-Vis foram realizados em um espectrofotômetro modelo GENESIS™ 140 *Visible Spectrophotometer* (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) equipado com duplo feixe de fotodiodos de silício, largura de banda espectral de 2 nm, faixa de comprimento de onda de 190 a 1100 nm, *software* próprio para salvar métodos, relatório e exportação de dados, adaptador Wi-Fi. Foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

3.4 PROCEDIMENTO PARA AS VALIDAÇÕES DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA PRIMAQUINA

A seletividade foi verificada através de injeções do BGE, da água, dos excipientes, do padrão do fármaco na concentração de 300 mg L^{-1} , da amostra na concentração de 300 mg L^{-1} , e da amostra+padrão, ambos na mesma concentração de 300 mg L^{-1} .

Para avaliação da linearidade, foram construídas as curvas de calibração para a primaquina, em triplicata. As soluções foram preparadas diretamente no *vial*, a partir da adição de alíquotas referentes a concentração desejada da solução estoque padrão de primaquina, com auxílio da micropipeta devidamente calibrada, seguida da adição de água deionizada, com volume total de 500 μL . Para o método com injeção pelo *outlet*, a curva foi avaliada em cinco níveis de concentração: 240, 270, 300, 330 e 360 mg L^{-1} (80 a 120%). Para o método com injeção múltipla, a curva foi avaliada em seis níveis de concentração: 240, 270, 300, 330, 360 e 390 mg L^{-1} (80 a 130%). As análises foram realizadas aleatoriamente, a normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade foi verificada pelo teste de Levene.

A precisão (repetibilidade) foi verificada através da injeção de seis soluções de primaquina nas condições otimizadas, preparadas diretamente no *vial* a partir da adição da alíquota referente a concentração desejada (100 mg L^{-1}) da solução estoque padrão de primaquina, com auxílio da micropipeta devidamente calibrada, seguida da adição de água deionizada, com volume total de 500 μL . Foram calculados os desvios padrão relativos

considerando-se a área sob os picos. Para a precisão intermediária foram utilizadas doze soluções de primaquina e avaliada em dias diferentes.

A exatidão foi verificada através de ensaios de recuperação, com fortificação da amostra com a solução do padrão de primaquina, em três níveis de concentração, em triplicata. As soluções foram preparadas diretamente no *vial*, em três etapas: para o *vial* de padrão, foi realizada uma diluição na concentração desejada a partir da solução estoque padrão de primaquina; para o *vial* de amostra, foi realizada uma diluição na concentração desejada a partir da solução estoque de amostra; para o *vial* de amostra+padrão, foram realizadas diluições nas concentrações desejadas a partir da solução estoque padrão de primaquina e da solução estoque de amostra. Todas as diluições foram feitas com auxílio da micropipeta devidamente calibrada, seguida da adição de água deionizada, com volume total de 500 μL . Para o método com injeção pelo *outlet*, foram selecionados os níveis de concentração: 240, 300 e 360 mg L^{-1} (80, 100 e 120%). Para o método com injeção múltipla, foram selecionados os níveis de concentração: 240, 300 e 390 mg L^{-1} (80, 100 e 130%).

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pela relação sinal/ruído, considerando o eletroferograma da amostra, em triplicata. As soluções foram preparadas diretamente no *vial*, a partir da adição de alíquotas referentes a concentração desejada (300 mg L^{-1}) da solução estoque padrão de primaquina, com auxílio da micropipeta devidamente calibrada, seguida da adição de água deionizada, com volume total de 500 μL .

3.5 PROCEDIMENTO PARA OS PLANEJAMENTOS DE EXPERIMENTOS

O estudo das condições instrumentais para o método com injeção pelo *outlet* foi realizado através de um planejamento de experimentos do tipo fatorial completo 3^2 com triplicata no ponto central, e sendo selecionados como fatores a concentração do BGE e a voltagem, com três níveis para cada fator. As tabelas referentes ao planejamento podem ser visualizadas na seção 4.1.2.

O estudo das condições instrumentais para o método com injeção múltipla foi realizado através de um planejamento de experimentos Box-Behnken 3^3 com triplicata no ponto central, e sendo selecionados como fatores o tempo de injeção do BGE espaçador, a voltagem e o número de injeções consecutivas, com três níveis para cada fator. As tabelas referentes ao planejamento podem ser visualizadas na seção 4.2.1.

3.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Ao ser utilizado um novo capilar, este era condicionado inicialmente com purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 20 minutos, seguido de água deionizada por 20 minutos e solução de eletrólito por 15 minutos.

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

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

No método da primaquina, o condicionamento entre as análises foi realizado com purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto, purga de HCl 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto e purga de eletrólito por 1 minuto.

No método do artemeter e lumefantrina o condicionamento entre as análises foi realizado com purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizadas por 1 minuto e purga de eletrólito por 1 minuto.

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 álcool isopropílico por 15 minutos em banho ultrassônico. Os *prepunchers* foram lavados em cada nova semana de trabalho com álcool isopropílico por 15 minutos em banho ultrassônico. A cela de detecção (também denominada alinhador pela Agilent Technologies) foi lavada a cada momento em que foi observado acúmulo de sujeira, também com álcool isopropílico por 15 minutos em banho ultrassônico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões referentes ao trabalho desenvolvido considerando os objetivos anteriormente mencionados.

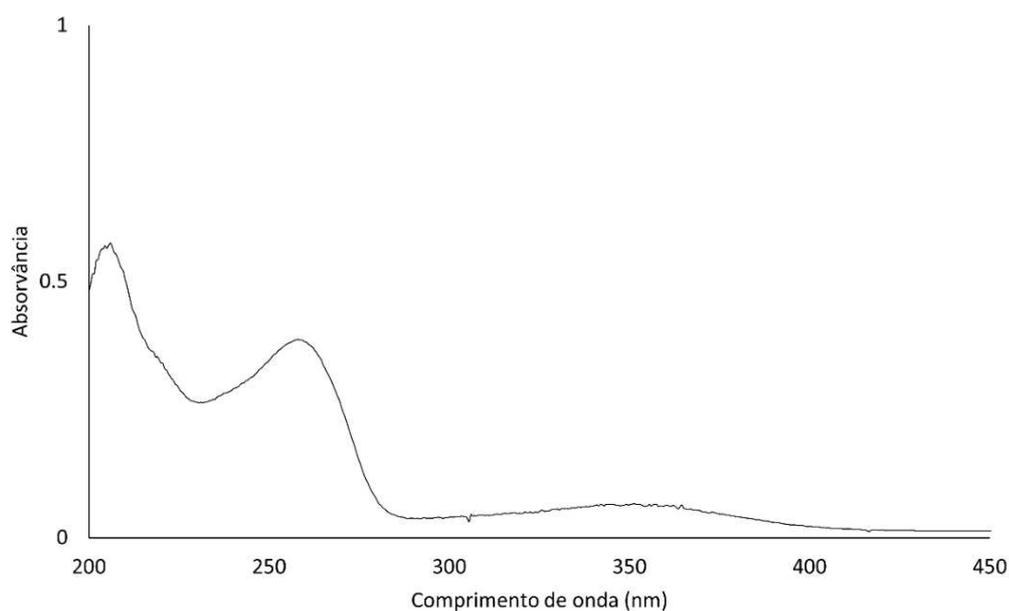
4.1 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV UTILIZANDO INJEÇÃO PELO OUTLET

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões referentes ao fármaco primaquina utilizando injeção pelo *outlet*.

4.1.1 Seleção do comprimento de onda

Inicialmente, foi realizado um estudo espectrofotométrico na região UV-Vis para selecionar o comprimento de onda mais adequado para a detecção da PQN. Na Figura 9 é apresentado o espectro de absorção da PQN, em que pode ser observado dois comprimentos de onda de maiores absorções, 206 e 265 nm. O comprimento de onda escolhido foi de 265 nm por ser mais seletivo, sendo menos influenciado por possíveis interferentes.

Figura 9 - Espectro de absorção da primaquina na concentração de 10 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.1.2 Otimização do eletrólito e das condições eletroforéticas de análise

Na CZE, a etapa de otimização do BGE é fundamental para promover uma separação mais adequada e eficiente dos analitos, pois uma variação no pH do tampão constituinte do BGE pode afetar o EOF e a mobilidade efetiva do composto (μ_{ef}) (Spudeit et al., 2016; Tavares, 1996). A curva de mobilidade efetiva versus pH (μ_{ef} x pH), discutida na seção 1.6.2, é um método teórico bastante útil para selecionar a faixa de pH adequada à separação. Quando há mais de um composto, o ideal é que as mobilidades efetivas dos analitos sejam diferentes para que a separação ocorra de forma eficiente. Por outro lado, para evitar o fenômeno da eletrodispersão e para obter uma boa simetria dos picos se faz necessário que a mobilidade do analito seja próxima da mobilidade do co-íon do tampão, que é escolhido através da avaliação da curva de mobilidade efetiva. A escolha do ânion do BGE também é importante, uma vez que deve apresentar baixa absorvidade molar perto do comprimento de onda do analito (Spudeit et al., 2016; Oliveira et al., 2012; Manoel, 20011; Silva et al., 2007; Baker, 1995).

Para a obtenção da curva de mobilidade efetiva da PQN, inicialmente foram calculadas as suas mobilidades eletroforéticas (μ_{PQN1} e μ_{PQN2}), através de injeções de uma solução do analito, com definição prévia das dimensões do capilar, da voltagem e da temperatura, em duas condições de pH diferentes, em pH 2,1 e pH 4,7. A partir dos valores do tempo de migração do analito e do EOF, as mobilidades eletroosmóticas (μ_{eo1} e μ_{eo2}), observadas (μ_{obs1} e μ_{obs2}) e eletroforéticas (μ_{PQN1} e μ_{PQN2}) foram calculadas pelas Equações 2, 6 e 5, respectivamente. Todos os parâmetros utilizados no cálculo das mobilidades podem ser visualizados na Tabela 4.

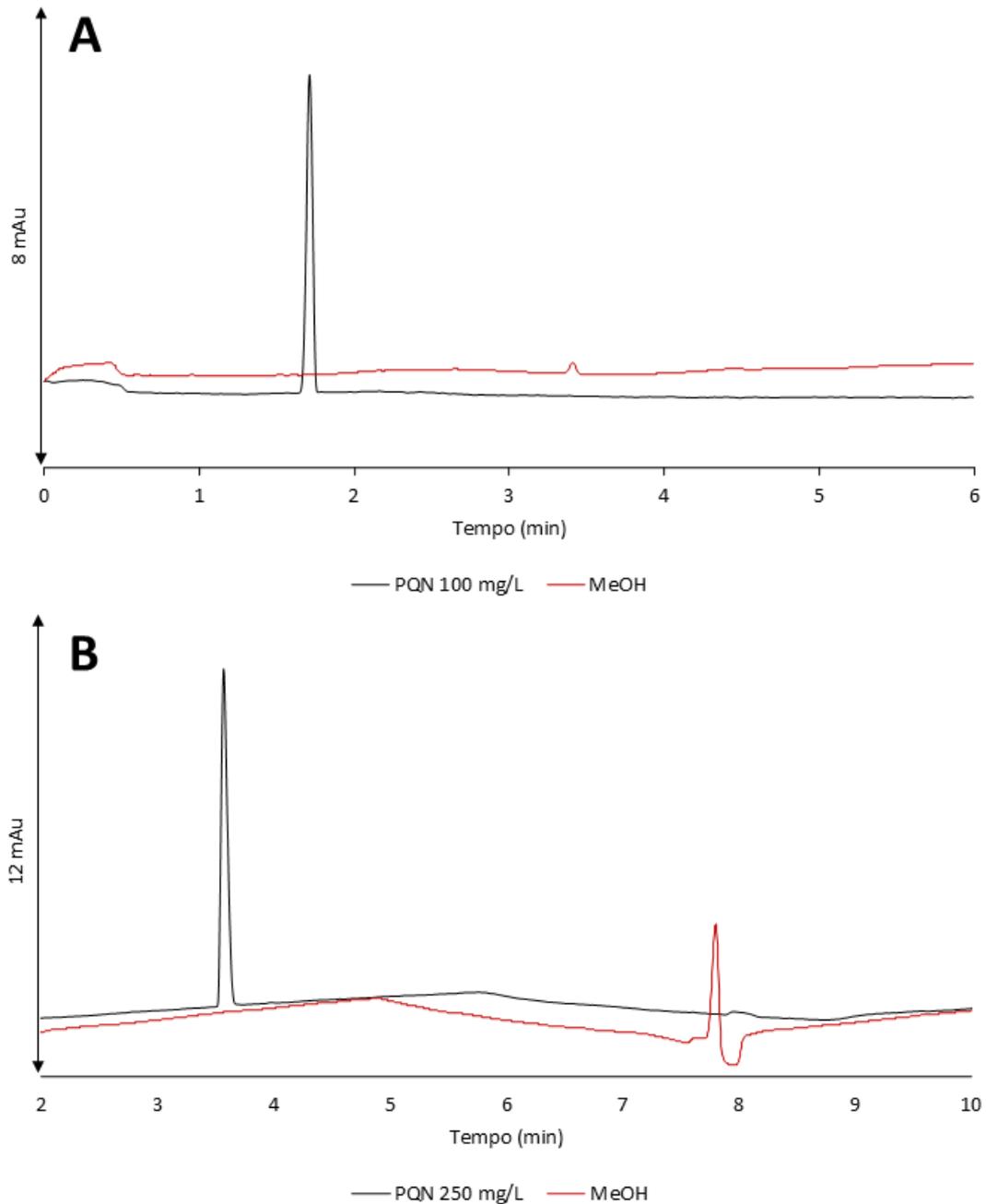
Tabela 4 - Valores dos parâmetros necessários para os cálculos das mobilidades eletroforéticas da primaquina.

pH	t_{PQN} (min)	t_{eo} (min)	V (kV)	L_{TOT} (cm)	L_{ef} (cm)	μ_{PQN} (x 10^{-5} , $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$)
2,1	1,72	3,41	20	33,5	25,0	20,2874
4,7	3,56	7,79	25	48,5	40,0	19,7216

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Na Figura 10 podem ser observados os eletroferogramas da PQN e do metanol nas duas condições de pH citadas anteriormente. Na Figura 9A o sinal em 1,72 min é referente a PQN e o sinal em 3,41 min é referente ao EOF, enquanto que na Figura 9B o sinal em 3,56 min é referente a PQN e o sinal em aproximadamente 8 min é referente ao EOF.

Figura 10 - Eletroferogramas da primaquina na concentração de 100 mg L⁻¹ e do MeOH em BGE Tris/HCl 10/20 mmol L⁻¹ (pH 2,1) (A) e da primaquina na concentração de 250 mg L⁻¹ e do MeOH em BGE acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 4,7) (B).



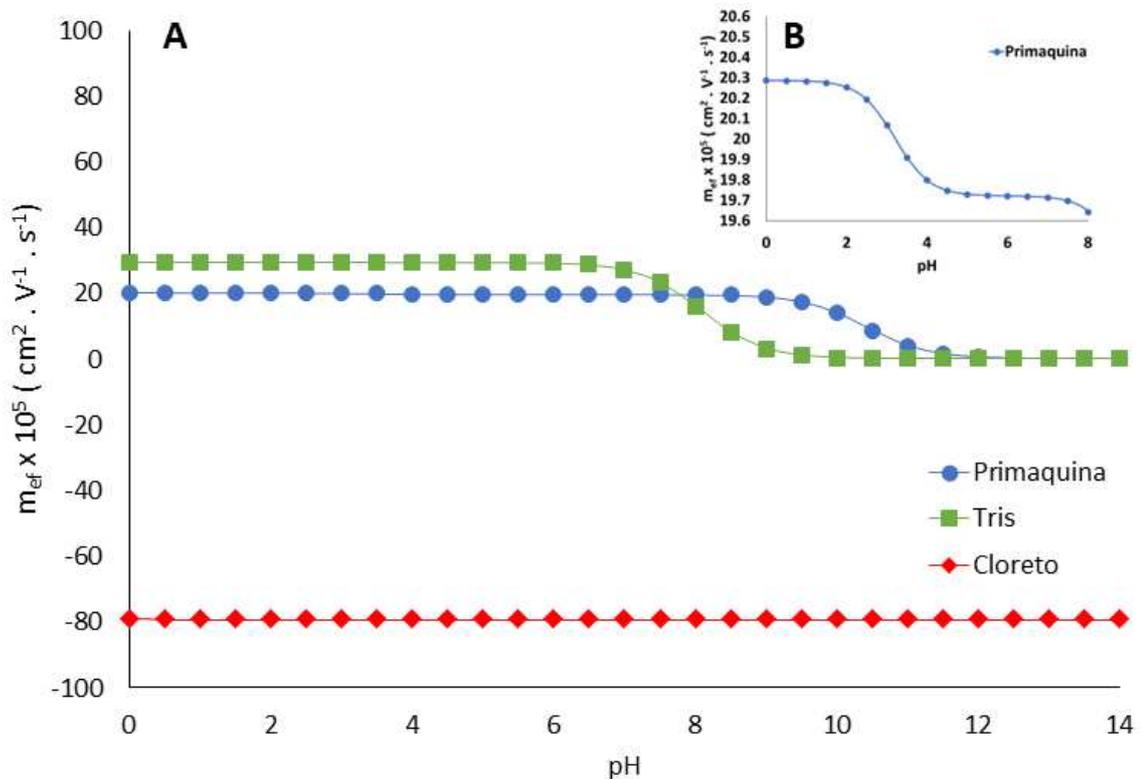
Condições: (A) BGE composto por Tris/HCl 10/20 mmol L⁻¹ (pH 2,1); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x 50 μm d.i.; 25 °C; +20 kV; 30 mbar x 5 s; 265 nm. (B) BGE composto por tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 4,7); capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 μm d.i.; 20 °C; +25 kV; 30 mbar x 5 s; 265 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A mobilidade efetiva da PQN foi calculada a partir dos valores das mobilidades eletroforéticas (μ_{PQN1} e μ_{PQN2}) e de suas respectivas frações de distribuição, de acordo com a

Equação 7, onde μ_i corresponde à mobilidade eletroforética do analito. A curva de mobilidade efetiva *versus* pH para a PQN, que pode ser observada na Figura 11, indica que em valores de pH menores que 3,2 (pK_{a1}) o composto está na sua forma catiônica com duas cargas positivas, entre pH 4,0 e 10,0, está na sua forma catiônica com uma carga positiva, e estará predominantemente na sua forma neutra em valores de pH acima de 10,4 (pK_{a3}). Na Figura 11B pode ser observada a região expandida da primeira inflexão da curva da primaquina, entre 19,6 e 20,6 $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Figura 11 - Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para a primaquina e para os componentes do eletrólito (A) e região expandida da primeira inflexão da curva da primaquina, entre 19,6 e 20,6 $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ (B).



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Dessa forma, foi proposto a utilização de um BGE com pH abaixo de 3,2 (pK_{a2}) do fármaco, devido a sua predominância na forma catiônica com duas cargas, garantindo assim que o analito estará ionizado durante a análise. Para as análises iniciais, foi utilizada uma solução de Tris/HCl na concentração de 10/20 mmol L^{-1} , em pH 2,0. Com o objetivo de avaliar a capacidade dessa solução eletrolítica na determinação do analito, também foram construídas as curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para os componentes do BGE: o Tris e o cloreto. Os dados para o

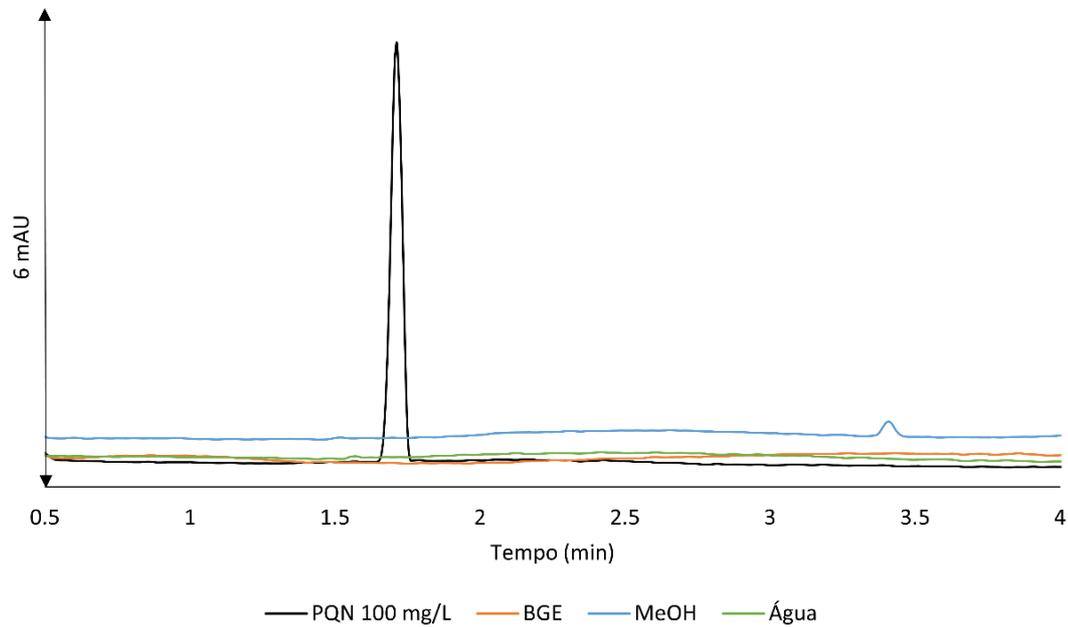
cálculo da mobilidade efetiva do Tris foram obtidos no *software* Peakmaster[®] ($pK_a = 8.0$ e $\mu_{\text{Tris}} = +29,5 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e para a mobilidade efetiva do cloreto os dados foram obtidos no trabalho de Hirokawa et al. (1983) ($pK_a = -6,3$ e $\mu_{\text{Cl}} = -79,1 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). As curvas de mobilidade efetiva *versus* pH do cloreto e do Tris podem ser observadas na Figura 11.

Avaliando a curva de mobilidade efetiva dos componentes do BGE, verificamos que Cl^- apresenta mobilidade constante em toda faixa de pH, uma vez que o HCl é um eletrólito forte em solução, ou seja, a sua ionização completa proporciona a não alteração na sua mobilidade efetiva com variações do pH. Para o Tris, há variações na sua mobilidade efetiva em função do pH da seguinte forma: a espécie protonada (TrisH^+) é predominante em pH até 6,0, no intervalo de pH de 6,0 a 9,0 há um equilíbrio entre a espécie protonada e a neutra (Tris), e por fim, a espécie neutra se torna predominante em pH maior que 9,5. Além disso, o Tris apresenta baixa absorvidade molar no comprimento de onda do analito e mobilidade efetiva próxima a PQN, com seus valores correspondentes a 29,5 e 19,7216 $\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, o que contribui para evitar a eletrodispersão e para obter uma boa simetria dos picos. Como ânion da solução eletrolítica, o cloreto possui a característica adequada, uma vez que possui baixa absorvidade molar no comprimento de onda utilizado (Oliveira et al., 2012; Manoel, 2011).

As análises iniciais foram realizadas com o BGE Tris/HCl em pH 2,0 na concentração de 10/20 mmol L^{-1} , em capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (série TSP) com 33,5 cm de comprimento total (25,0 cm de comprimento efetivo) com 50 μm d.i. e 375 μm d.e. A temperatura do capilar foi mantida em 25 °C, com voltagem positiva de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 30 mbar por 5 s, e detecção em 265 nm. O condicionamento entre as análises foi realizado com purga de solução de NaOH 1 mol L^{-1} por 30 segundos, purga de água deionizada por 30 segundos e purga de BGE por 30 segundos.

Na Figura 12 são apresentados os eletroferogramas da PQN na concentração de 100 mg L^{-1} (linha preta), do BGE (linha laranja), do MeOH (linha azul) e da água (linha verde) quando se utiliza 10/20 mmol L^{-1} de Tris/HCl em pH 2,0. O MeOH foi utilizado para identificar o sinal referente ao EOF. Pode-se observar um pico em 1,7 min referente a PQN (linha preta) e outro em aproximadamente 3,5 min referente ao EOF. Em meio ácido, o EOF é fraco pois os grupos silanóis no interior do capilar estão protonados, e quando há interação com o ácido, os grupos ficam neutros (formação de $-\text{OH}$), diminuindo a movimentação de cargas (Baker, 1995).

Figura 12 - Eletroferogramas da PQN na concentração de 100 mg L^{-1} , do BGE, da água e do MeOH.

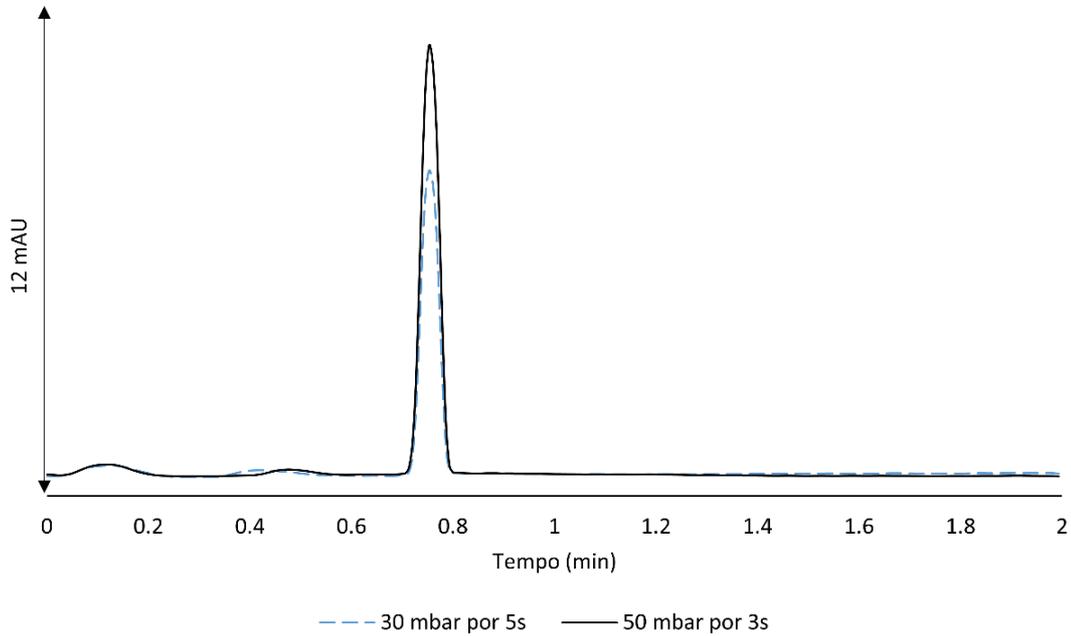


Condições: BGE composto por Tris/HCl $10/20 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 30 mbar x 5 s (*inlet*); 265 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Com o objetivo de diminuir o tempo de migração, foi feita a injeção pelo *outlet*, em que o comprimento efetivo do capilar passou a ser de 8,5 cm, mantendo as condições instrumentais. O tempo de migração da PQN foi reduzido para 0,75 min. A fim de obter um pico mais fino e simétrico, foi feita a mudança na injeção de 30 mbar por 5 s para 50 mbar por 3 s, conforme pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Eletroferogramas da primaquina na concentração de 100 mg L^{-1} , e injeção hidrodinâmica, pelo *outlet*, 30 mbar por 5 s e 50 mbar por 3s.



Condições: BGE composto por Tris/HCl $10/20 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \text{ }\mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 265 nm.
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 com o objetivo de verificar a melhor condição de análise. Considerando três níveis e dois fatores, foram selecionados como fatores a concentração do BGE e a voltagem, com três níveis para cada fator, que podem ser vistos na Tabela 5. A matriz de planejamento é mostrada na Tabela 6.

Tabela 5 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3^2 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas do método com injeção pelo *outlet*.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração do BGE Tris/HCl (mmol L^{-1})	10/20	20/30	30/40
Voltagem (kV)	20	25	30

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

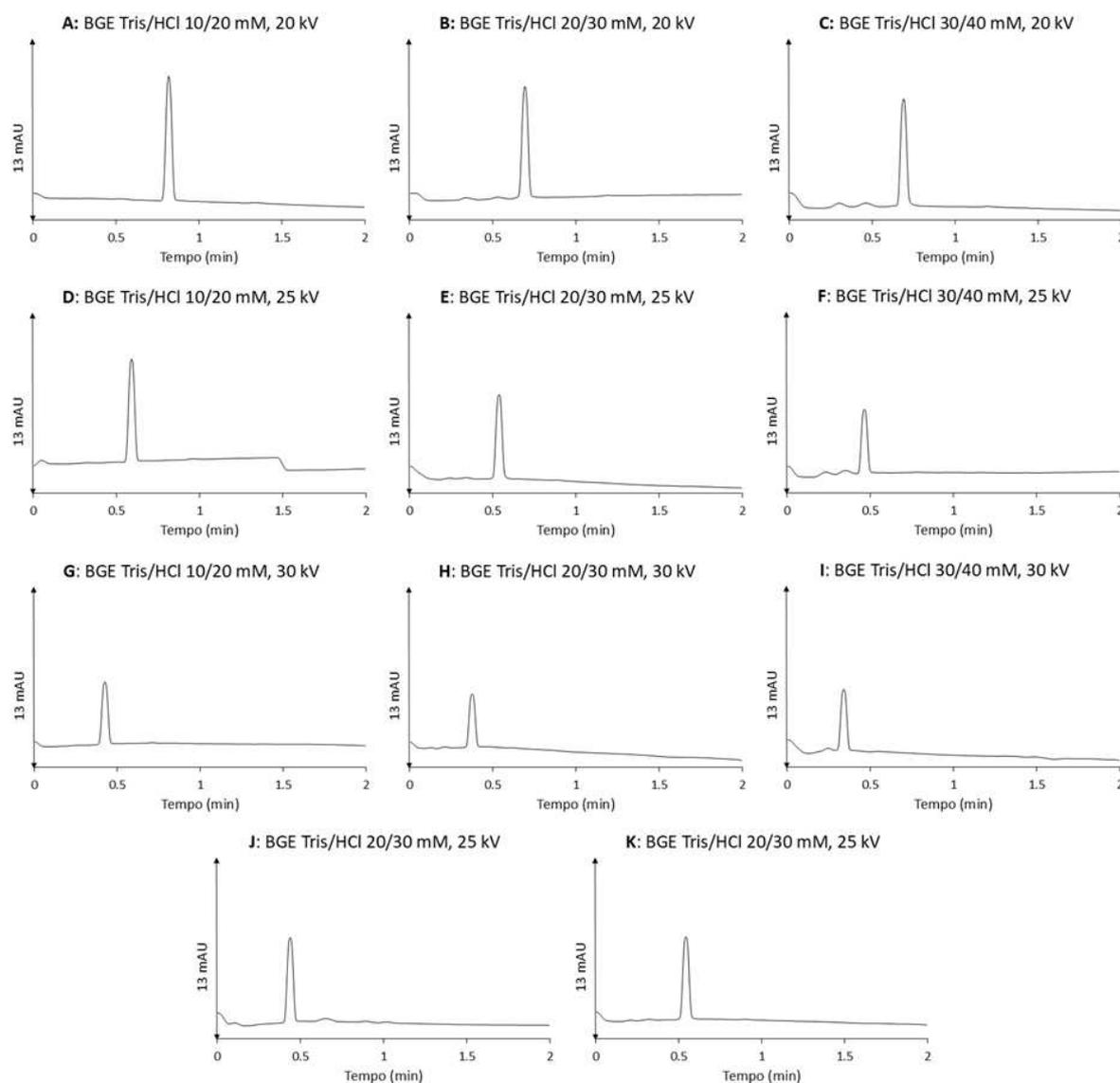
Tabela 6 - Matriz de planejamento fatorial 3^2 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas do método com injeção pelo *outlet*.

Ensaio	Concentração do BGE Tris/HCl (mmol L ⁻¹)	Voltagem (kV)	Área (min)
1	-1	-1	22,42
2	0	-1	22,33
3	1	-1	19,78
4	-1	0	17,94
5	0	0	14,39
6	1	0	11,29
7	-1	1	11,91
8	0	1	9,75
9	1	1	10,09
10	0	0	14,94
11	0	0	14,83

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Na Figura 14 podemos observar todos os eletroferogramas referentes ao planejamento, incluindo a triplicata no ponto central.

Figura 14 - Eletroferogramas dos ensaios do planejamento fatorial 3^2 , referente ao método com injeção pelo *outlet*, e primaquina na concentração de 100 mg L^{-1} .



Condições: capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 50 mbar x 3 s (*outlet*); 265 nm .
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

De forma geral, em todos os ensaios foi possível observar o sinal referente a PQN e a resposta do planejamento foi uma avaliação dos valores da área do pico, bem como a intensidade do sinal, uma vez que o tempo de migração em todos os ensaios foram abaixo de 1 minuto. Na Tabela 6 podem ser observados os valores das áreas referentes a cada ensaio. Os ensaios que apresentaram maiores valores de área do pico e maior intensidade do sinal foram os ensaios A, B e C. As condições dos ensaios A, B e C são $10/20 \text{ mmol L}^{-1}$ Tris/HCl com

+20 kV, 20/30 mmol L⁻¹ Tris/HCl com +20 kV, e 30/40 mmol L⁻¹ Tris/HCl com +20 kV, respectivamente.

Com o objetivo de definir qual a condição mais adequada, foi realizado um estudo de repetibilidade dos ensaios A, B e C, através de dez injeções consecutivas do padrão do fármaco na concentração de 100 mg L⁻¹. Na Tabela 7 são mostrados os valores de média e de desvio padrão relativo, considerando as áreas dos picos.

Tabela 7 - Estudo de repetibilidade dos ensaios A, B e C do método com injeção pelo *outlet*.

	Ensaio A	Ensaio B	Ensaio C
Média da área do pico*	21,81	22,01	19,39
RSD (%)*	9,47	2,75	7,72

*($n = 10$)

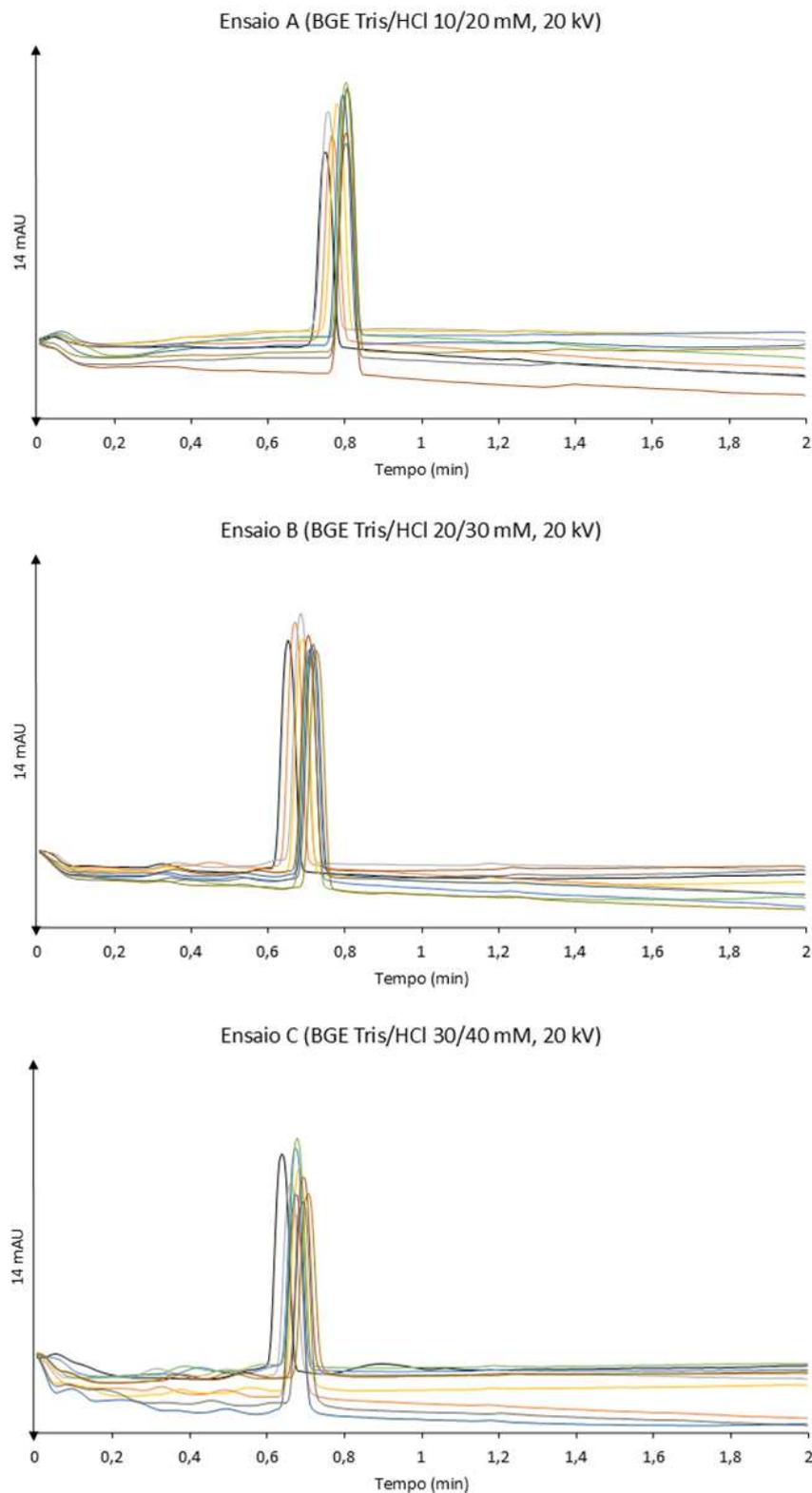
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Pela Tabela 7 podemos observar que o ensaio B apresentou menor valor de RSD do que os ensaios A e C, fato que é ilustrado pelos eletroferogramas das dez injeções, Figura 15, indicando uma menor variabilidade nas injeções. Neste contexto, o ensaio B foi escolhido como condição adequada para análise da PQN.

Entretanto, observando os eletroferogramas do ensaio B na Figura 15, ainda havia pequenas variações quanto a área e o tempo de migração do composto. Dessa forma, para diminuir a variação no tempo de migração e evitar alargamento do pico, garantindo a repetibilidade, foi feita a injeção de BGE após a injeção da amostra, na mesma condição de 50 mbar por 3 s. Além disso, no condicionamento entre as análises foi acrescentado um purga com solução de 1 mol L⁻¹ de HCl para evitar que cátions se liguem aos grupos silanóis nas paredes do capilar e alterem o EOF, influenciando também no tempo de migração. O novo condicionamento entre corridas consistiu em purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto, purga de HCl 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto e purga de BGE por 1 minuto.

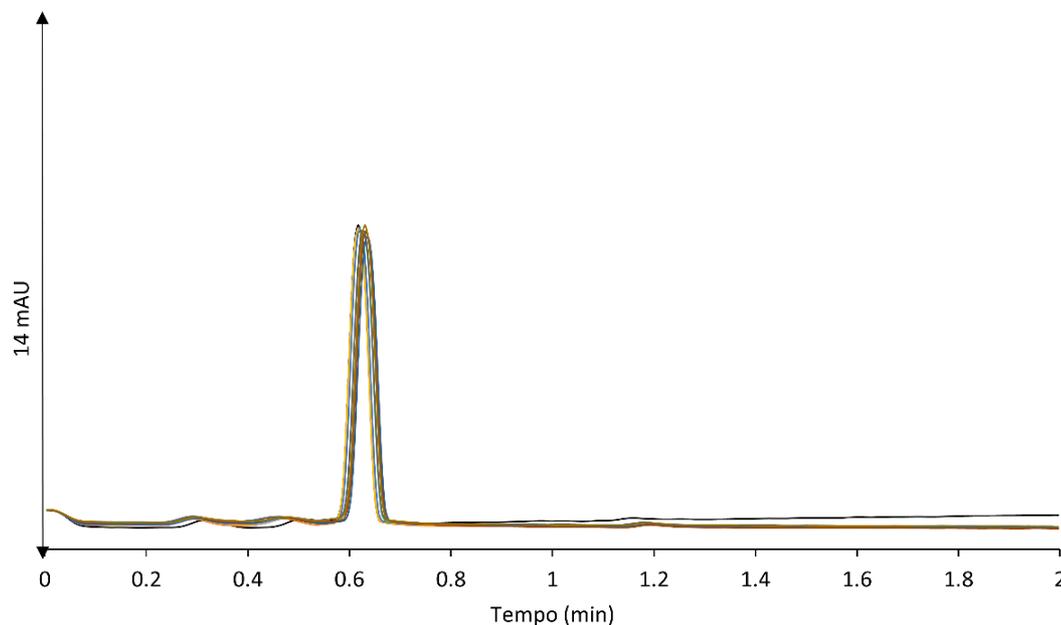
Em seguida, foi feito um novo estudo de repetibilidade, considerando essas novas condições. Na Figura 16 podem ser observados os eletroferogramas das dez injeções consecutivas de padrão de PQN na concentração de 100 mg L⁻¹. As implementações das alterações foram satisfatórias, ocorrendo diminuição na variação do tempo de migração, mantendo em aproximadamente 0,6 min.

Figura 15 - Eletroferogramas do estudo de repetibilidade dos ensaios A, B e C do método com injeção pelo *outlet*, e primaquina na concentração de 100 mg L⁻¹.



Condições: capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x 50 μ m d.i.; 25 $^{\circ}$ C; +20 kV; 50 mbar x 3 s (amostra e BGE) (*outlet*); 265 nm.
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 16 - Eletroferogramas do estudo de repetibilidade após condicionamento com purga de HCl 1 mol L⁻¹, do método com injeção pelo *outlet* e primaquina na concentração de 100 mg L⁻¹.



Condições: BGE Tris/HCl 20/30 mmol L⁻¹ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x 50 µm d.i.; 25 °C; +20 kV; 50 mbar x 3 s (amostra e BGE) (*outlet*); 265 nm.
 Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O método desenvolvido e otimizado possui as seguintes características: capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (serie TSP) com comprimento total de 33,5 cm (25,0 cm efetivo) e 50 µm d.i. x 375 µm d.e.; temperatura do capilar mantida em 25 °C, voltagem positiva de 20 kV; injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 3 s para as amostras e para o BGE; BGE constituído por tampão Tris/HCl na concentração de 20/30 mmol L⁻¹ em pH 2,0; detecção em 265 nm. O condicionamento entre corridas foi estabelecido em purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto, purga de HCl 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto e purga de solução de BGE por 1 minuto.

O método desenvolvido apresenta um tempo de migração da PQN de 0,6 min e um tempo total de análise de 6,1 min, considerando o tempo de corrida e o tempo de condicionamento entre corridas. Uma vez que uma amostra pode ser analisada em uma única corrida, dentro de uma hora de aplicação do método, 9 injeções podem ser realizadas.

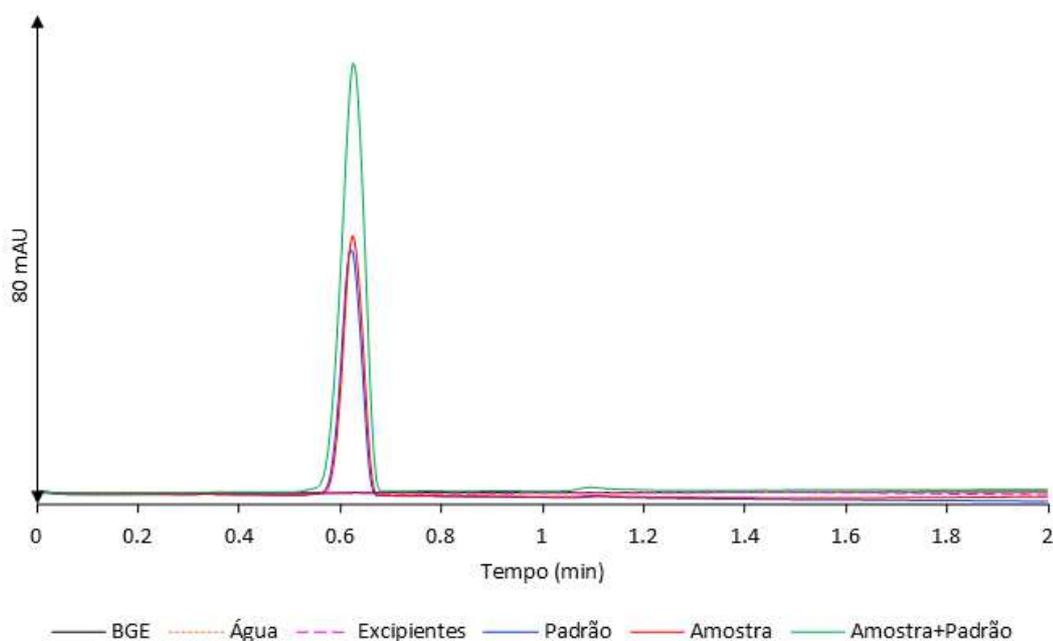
4.1.3 Validação do método analítico

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados através de ensaios com as soluções padrões e amostra (ICH, 2022; INMETRO, 2020, Brasil, 2017, Ribani et al., 2004).

4.1.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da realização de injeções do BGE, da água, dos excipientes, do padrão de PQN, da amostra, e da amostra + padrão de PQN. O padrão foi injetado na concentração de 300 mg L^{-1} de PQN, e a amostra também foi preparada na mesma concentração. A Figura 17 apresenta os eletroferogramas para a avaliação da seletividade. Nos eletroferogramas da água, do BGE e dos excipientes não foram observados nenhum pico, enquanto que nos demais eletroferogramas há o pico da PQN em, aproximadamente, 0,6 min. O método, portanto, é seletivo pois há somente o sinal referente ao fármaco desejado.

Figura 17 - Avaliação da seletividade do método com injeção pelo *outlet*.



Condições: BGE Tris/HCl $20/30 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 50 mbar x 3 s (padrão/amostra e BGE) (*outlet*); 265 nm; concentração de 300 mg L^{-1} para o padrão e amostra.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.1.3.2 Linearidade

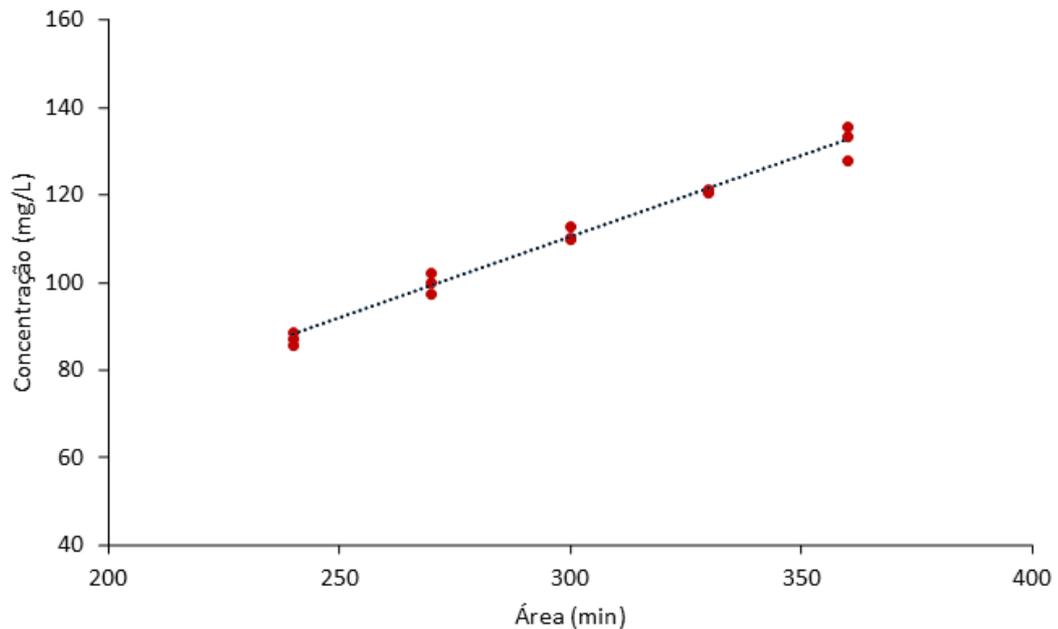
A linearidade do método foi avaliada através da construção da curva analítica com cinco níveis de concentração, na faixa de 80 a 120% em relação a concentração do analito na amostra (Brasil, 2017, Ribani et al., 2004). A partir da solução estoque de difosfato de PQN na concentração de 1000 mg L⁻¹ foram feitas as diluições necessárias para obter as concentrações descritas na Tabela 8, cada nível em triplicata. As soluções foram injetadas e analisadas no equipamento de CE de forma aleatória. A Tabela 8 também apresenta os valores das áreas dos picos de cada réplica e de RSD. Todos os valores de RSD foram inferiores a 5% (INMETRO, 2020).

Tabela 8 - Valores de área e RSD (%) para obtenção da curva analítica da primaquina no método de injeção pelo *outlet*.

Faixa de concentração	Concentração (mg L ⁻¹)	Área (min)	Média ± RSD (%)
80%	240	87,5	87,33 ± 1,78
		85,7	
		88,8	
90%	270	100,3	100,13 ± 2,35
		97,7	
		102,4	
100%	300	110,5	111,23 ± 1,54
		110,0	
		113,2	
110%	330	120,7	121,20 ± 0,38
		121,3	
		121,6	
120%	360	128,2	132,67 ± 3,03
		136,0	
		133,8	

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para obtenção da curva analítica, e dos valores dos coeficientes angular, linear e de correlação. A curva obtida tem equação $y = 0,3724x - 1,22$ e $r = 0,9917$. O valor do coeficiente de correlação é próximo de 1,0, indicando que o ajuste feito pelo modelo é satisfatório. A Figura 18 ilustra a curva analítica da PQN no método de injeção pelo *outlet*.

Figura 18 - Curva analítica da primaquina no método de injeção pelo *outlet*.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O modelo de regressão proposto só pode ser utilizado se sua linearidade for verificada e se não apresentar evidências de falta de ajuste. Nesse caso, se faz necessário a realização de testes de significância da regressão e de falta de ajuste. Esses testes foram feitos através da análise de variância, conforme os cálculos descritos por Pimentel e Barros Neto (1996) na seção 1.8.2. 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 a avaliação da 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. Além disso, os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência também foram avaliados. O pressuposto da independência foi satisfeito devido às soluções dos padrões terem sido injetadas 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 valor-de-p deve ser maior que 0,05. Na Tabela 9 podem ser vistos os resultados estatísticos para os testes de significância da regressão e falta de ajuste, além da verificação dos pressupostos.

Tabela 9 - Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado para ajuste do modelo do método com injeção pelo *outlet*.

Falta de ajuste	F_{cal}	0,79
	F_{tab}	3,71
Significância da regressão	F_{cal}	714,41
	F_{tab}	4,67
Normalidade	valor-de-p	> 0,100
Homocedasticidade		0,530

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Observando os resultados estatísticos da Tabela 9, não há falta de ajuste no modelo à 95 % de confiança, uma vez que $F_{cal} < F_{tab}$ e o modelo apresenta uma relação linear, ou seja, regressão significativa, pois $F_{cal} > F_{tab}$. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade também foram satisfeitos pois os valores-de-p foram maiores do que 0,05, indicando que os dados seguem uma distribuição normal e são homocedásticos.

4.1.3.3 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada através do RSD de seis medidas sucessivas da amostra, considerando-se a área sob os picos do analito, obtendo valor de RSD = 1,15%. A precisão intermediária foi avaliada através do RSD de doze medidas sucessivas da amostra, em termos da área do analito, em dois dias distintos, obtendo valor de RSD = 2,29%. Os valores de RSD foram inferiores a 5%, indicando que o método apresenta boa precisão (INMETRO, 2020). O preparo da amostra para a avaliação da precisão foi realizado de forma autêntica.

4.1.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, com fortificação da amostra com soluções dos padrões, em três níveis de concentração em triplicata. Os níveis de concentração escolhidos foram 80, 100 e 120% da curva analítica, que correspondem as concentrações de 240, 300 e 360 mg L⁻¹, respectivamente. Na Tabela 10 podem ser observados as porcentagens de recuperação médias. Os valores são satisfatórios e estão dentro da faixa aceitável para recuperação, 90 a 110% (ICH, 2022; INMETRO, 2020).

Tabela 10 - Porcentagem de recuperação média para a primaquina pelo método com injeção pelo *outlet*.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
240	91,14 ± 3,03
300	99,78 ± 2,88
360	99,08 ± 0,58

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.1.3.5 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados pela relação sinal/ruído, considerando as Equações 14 e 15. As amostras foram preparadas em triplicatas autênticas e o valor médio para o LD é de 2,20 mg L⁻¹, enquanto que o valor médio para o LQ é de 7,34 mg L⁻¹. Ambos os valores foram menores do que as concentrações do primeiro ponto da curva, 240 mg L⁻¹, mostrando a boa sensibilidade do método.

4.1.4 Quantificação de primaquina em comprimidos

Amostras de comprimido de PQN, contendo 15 mg do princípio ativo, foram analisadas em triplicatas autênticas, pelo método desenvolvido e otimizado por CZE-UV com injeção pelo *outlet*, considerando o modelo de regressão implementado, discutido na seção 4.1.3.2, expresso pela equação da curva $y = 0,3724x - 1,22$ e $r = 0,9917$. Os resultados podem ser observados na Tabela 11. O teor encontrado de 94,90% está dentro da faixa aceitável, de 90-110%, ou seja, a massa do princípio ativo encontrada no medicamento é próxima ao valor declarado no rótulo (BRASIL, 2024c; ICH, 2022; INMETRO, 2020).

Tabela 11 - Quantificação de primaquina em comprimidos pelo método com injeção pelo *outlet*.

Réplica	Valor encontrado (mg)	Valor declarado (mg)	Média (mg)	Teor (%)
1	14,22			
2	14,02	15,00	14,23	94,90
3	14,45			

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

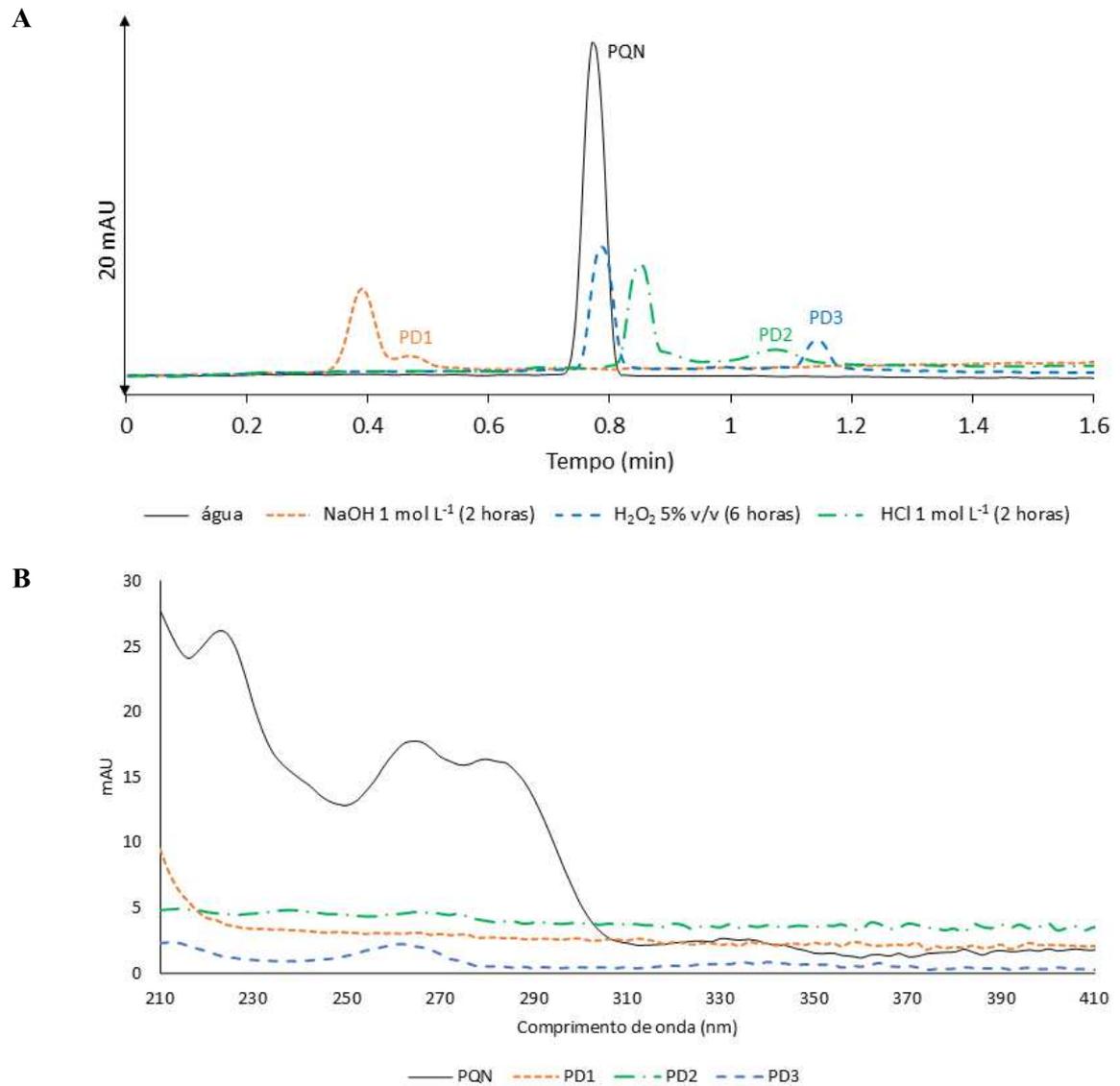
4.1.5 Determinação de produtos de degradação da primaquina

Um estudo de degradação forçada foi realizado para demonstrar a aplicação qualitativa do método por CZE-UV com injeção pelo *outlet* além da dosagem do IFA em formulações farmacêuticas. Na Figura 19 podem ser observados os eletroferogramas do estudo de degradação em comprimidos de PQN (A) e os espectros UV correspondentes (B).

Conforme descrito na seção 3.2.2, a solução estoque padrão de PQN e os comprimidos de PQN foram submetidas as seguintes condições de estresse: hidrólise alcalina, hidrólise ácida, hidrólise neutra e oxidação. Após períodos específicos (2h, 4h, 6h, 8h e 10h), alíquotas de cada solução foram retiradas, transferidas para *vials* e injetadas no equipamento de CE, imediatamente após completar o período de tempo desejado. Os resultados descritos a seguir são referentes ao período de tempo, para cada condição em estudo, em que foi possível observar o primeiro sinal de degradação do fármaco.

Após duas horas, picos de produtos de degradação foram observados nas condições de hidrólise alcalina e ácida (PD1 e PD2, respectivamente), com tempos de migração maiores que o pico de PQN, em seus respectivos eletroferogramas, tanto no padrão de PQN quanto nos comprimidos. No entanto, os picos na hidrólise alcalina apresentaram tempos de migração menores que o pico de PQN em condições aquosas (linha preta). Na presença de H₂O₂ 5% v/v, um produto de degradação (PD3) foi observado em 1,15 min, após 6 horas. Nenhuma degradação foi detectada em condições neutras em nenhum momento. Esses resultados demonstram que uma técnica de separação é essencial para realizar esse monitoramento, uma vez que o método tradicional de espectrofotometria UV-Vis fornece informações com espectros sobrepostos.

Figura 19 - Eletroferogramas do estudo de degradação forçada da primaquina em diferentes condições de estresse (A) e espectros de absorção UV referentes aos produtos de degradação (PD) (B).



Condições: BGE Tris/HCl 20/30 mmol L⁻¹ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x 50 μm d.i.; 25 °C; +20 kV; 50 mbar x 3 s (padrão/amostra e BGE) (*outlet*); 265 nm.
 Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV UTILIZANDO INJEÇÃO MÚLTIPLA

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões referentes ao fármaco primaquina utilizando injeção múltipla.

Com o objetivo de aumentar a frequência analítica, ou seja, aumentar a quantidade de análises completas o método analítico consegue realizar em um determinado período de tempo, foi feita a otimização de um método considerando injeção múltipla, partindo das condições otimizadas no método pelo *outlet*. Há alguns trabalhos na literatura que relatam o uso desse tipo de injeção em CE (Vital et al., 2025; Nascimento et al., 2022; Ly et al., 2022; Saoi et al., 2019; Kuehnbaum et al., 2013; Amini et al., 2008).

4.2.1 Otimização das condições eletroforéticas de análise

Para verificar qual a melhor condição de análise foi realizado um planejamento Box-Behnken 3^3 , que é um planejamento fatorial incompleto de três níveis e três fatores. Foram selecionados como fatores o tempo de injeção do BGE espaçador, a voltagem e o número de injeções consecutivas, com três níveis para cada fator, que podem ser vistos na Tabela 12. As demais condições instrumentais foram as mesmas otimizadas para o método pelo *outlet*, porém a realização de injeção múltipla foi feita com injeção no modo tradicional, ou seja, pelo *inlet*.

A resposta do planejamento foi a combinação entre uma avaliação qualitativa do perfil de separação dos picos e uma avaliação quantitativa através do cálculo da estatística de resolução cromatográfica (CRS, do inglês *Chromatographic Resolution Statistics*) (Nascimento et al., 2022, Zhu et al., 2012; McGuffin e Tavares, 1997). Esse parâmetro é relevante nesse caso pois possibilita avaliar e estudar a resolução de todos os picos presentes em cada eletroferograma simultaneamente, relacionando-a com o tempo de análise. O CRS foi calculado através da Equação 16, sendo que o menor valor de CRS está correlacionado com a melhor separação.

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_{i,i+1} - R_{ot})^2}{(R_{i,i+1} - R_{min})^2 R_{i,i+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1)R_{med}^2} \right\} \cdot \frac{t_n}{n} \quad (16)$$

onde $R_{i,i+1}$ é a resolução entre pares de picos adjacentes, R_{med} é a resolução média entre os pares de picos, R_{ot} é a resolução ideal ou desejada (1,5), R_{min} é a resolução mínima aceitável (1,0), t_n é o tempo de migração do último pico e n é o número de picos (3, 6 ou 9). A resolução foi calculada utilizando a largura à meia altura.

A matriz de planejamento é mostrada na Tabela 13 junto com os valores de CRS para cada ensaio. Nas Figura 20 podemos observar todos os eletroferogramas referentes ao planejamento, incluindo a triplicata no ponto central (ensaio 13, 14 e 15).

Tabela 12 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas para o método com injeção múltipla.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo de injeção do BGE espaçador (s)	12	15	18
Voltagem (kV)	15	20	25
Número de injeções	3	6	9

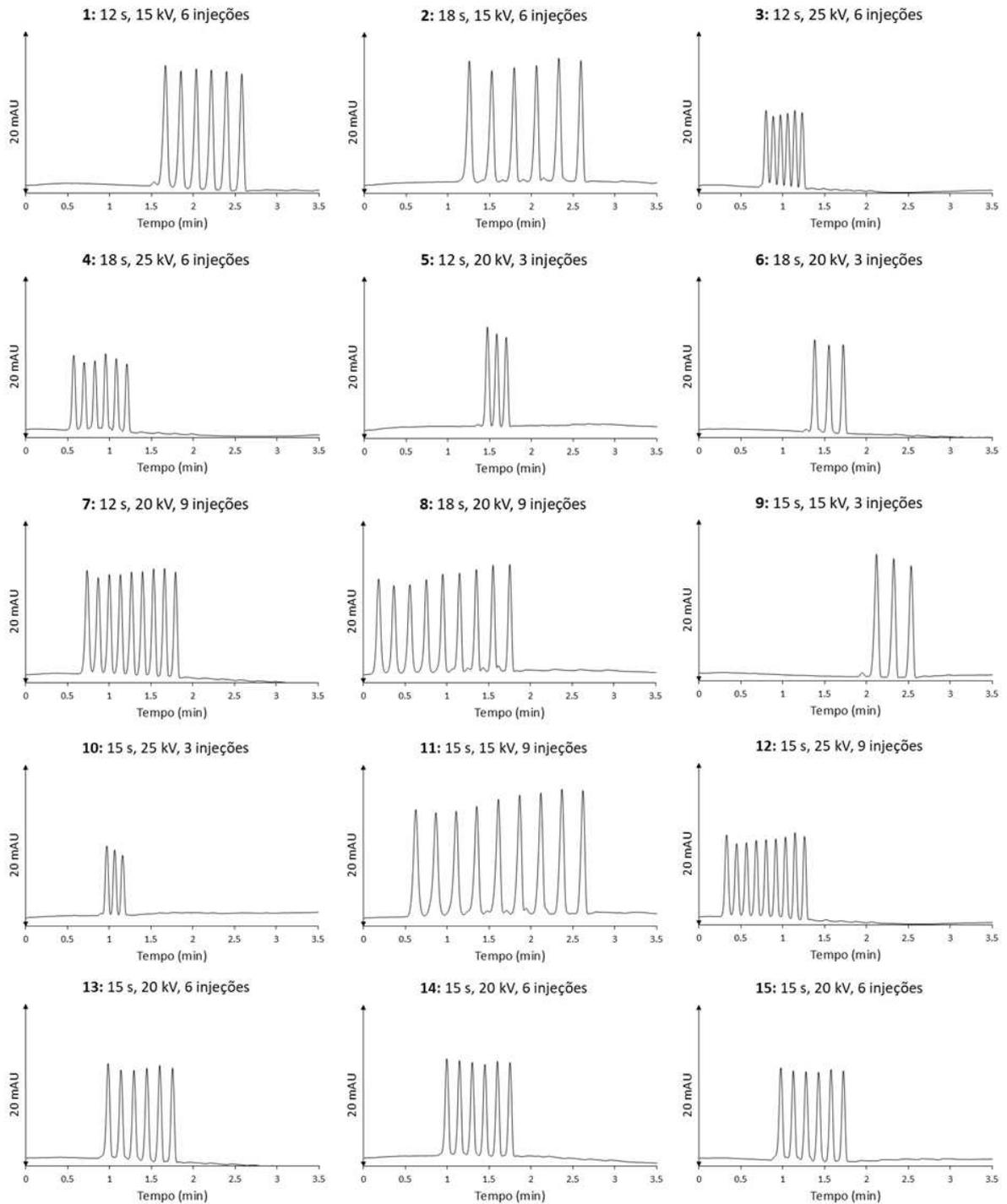
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 13 - Matriz de planejamento Box-Behnken 3^3 para o estudo de otimização das condições eletroforéticas para o método com injeção múltipla.

Ensaio	Tempo de injeção do BGE espaçador (s)	Voltagem (kV)	Número de injeções	CRS
1	-1	-1	0	100,82
2	1	-1	0	1,08
3	-1	1	0	2043,37
4	1	1	0	16,98
5	-1	0	-1	1646,25
6	1	0	-1	0,45
7	-1	0	1	5900,22
8	1	0	1	3123,57
9	0	-1	-1	0,61
10	0	1	-1	14,41
11	0	-1	1	28,45
12	0	1	1	6121,05
13	0	0	0	0,58
14	0	0	0	0,65
15	0	0	0	2,14

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 20 - Eletroferogramas dos ensaios do planejamento Box-Benhken 3^3 , referente ao método com injeção múltipla, com a primaquina na concentração de 100 mg L^{-1} .



Condições: BGE Tris/HCl $20/30 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $50 \text{ mbar} \times 3 \text{ s}$ (amostra); 265 nm ; concentração de 300 mg L^{-1} para o padrão e amostra.
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Observando os eletroferogramas na Figura 20, na aplicação da voltagem de $+25 \text{ kV}$ (ensaios 3, 4, 10 e 12) ocorreu uma diminuição do tempo de análise, abaixo de $1,5 \text{ min}$, e

promoveu um perfil de separação, de forma qualitativa, com menor resolução entre os picos, com alturas entre os sinais diferentes, além de menores valores de áreas. Essas considerações podem ser corroboradas pelo valor de CRS muito maior que 1 dos ensaios 3, 4, 10 e 12.

Nos ensaios com a voltagem intermediária de +20 kV (ensaios 5, 6, 7, 8, 13, 14 e 15) todos os sinais foram obtidos abaixo de 2 min, independente do tempo do eletrólito espaçador e do número de injeções. De forma qualitativa, esses ensaios apresentaram resolução entre os picos adequada, maiores valores de áreas do que os ensaios com voltagem maior, porém ainda há em alguns ensaios diferenças nas alturas dos sinais. Essas considerações podem ser corroboradas pelo valor de CRS muito maiores de 1 dos ensaios 5, 7, 8, e próximos de 1 dos ensaios 6, 13, 14 e 15.

Nos ensaios com a voltagem menor de +15 kV (ensaios 1, 2, 9, 11) é perceptível o aumento no tempo de migração para próximo de 2,6 min, além maior resolução e simetria entre os picos quando são realizadas 6 injeções (ensaios 1 e 2). Qualitativamente, quando são realizadas 3 ou 9 injeções, há uma diminuição na simetria dos picos. Entretanto, essas observações diferem dos valores de CRS obtidos, uma vez que os ensaios 2 e 9 possuem valor de CRS próximos de 1 e os ensaios 1 e 11 possuem valores de CRS acima de 1.

Além disso, ao aumentar o tempo do eletrólito espaçador para 18 s (ensaios 2, 4, 6 e 8) é notável o aumento do tempo de análise, atingindo cerca de 2,6 min, na condição em que a voltagem é menor, +15 kV (ensaio 2) e, de menor que 2 min, nas condições com voltagem de +20 kV (ensaio 6 e 8).

Os valores de CRS abaixo de 1 foram obtidos para os ensaios 6 (0,45), 13 (0,58), 9 (0,61) e 14 (0,65), respectivamente. O ensaio 2 apresentou valor de CRS próximo de 1 (1,08). Os demais ensaios possuem CRS acima de 2.

Nesse contexto, os ensaios 2, 6, 9, 13 e 14 foram selecionados para realizar um estudo de repetibilidade com o objetivo de definir a melhor condição de análise, através de 6 injeções consecutivas do padrão do fármaco na concentração de 100 mg L⁻¹. As Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18 mostram os valores de área para cada sinal, bem como o valor de área média e o desvio padrão relativo (RSD).

Tabela 14 - Estudo de repetibilidade para o ensaio 2 do método com injeção múltipla.

Repetição	Área do pico 1	Área do pico 2	Área do pico 3	Área do pico 4	Área do pico 5	Área do pico 6	Média	RSD (%)
1	47,45	50,43	50,10	49,87	49,94	49,04	49,47	2,21
2	47,17	49,61	49,68	49,51	49,69	48,30	48,99	2,13
3	47,32	49,97	49,48	49,17	49,14	47,34	48,74	2,31
4	47,78	49,17	49,77	49,17	49,55	47,16	48,76	2,15
5	47,38	48,82	48,77	48,34	48,52	46,06	47,98	2,25
6	46,78	48,48	48,32	47,85	47,89	45,54	47,48	2,36
Média	47,31	49,41	49,35	48,98	49,12	47,24		
RSD (%)	0,70	1,48	1,36	1,53	1,59	2,78		

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 15 - Estudo de repetibilidade para o experimento 6 do método com injeção múltipla.

Repetição	Área do pico 1	Área do pico 2	Área do pico 3	Média	RSD (%)
1	22,50	24,89	23,86	23,75	5,04
2	22,92	27,94	21,44	24,10	14,14
3	22,53	21,77	17,05	20,45	14,52
4	19,48	22,01	16,70	19,40	13,68
5	22,00	25,68	19,49	22,39	13,92
6	26,51	28,18	22,63	25,77	11,05
Média	22,66	25,08	20,19		
RSD (%)	9,97	11,07	14,60		

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 16 - Estudo de repetibilidade para o experimento 9 do método com injeção múltipla.

Repetição	Área do pico 1	Área do pico 2	Área do pico 3	Média	RSD (%)
1	46,46	49,56	48,61	48,21	3,30
2	38,66	40,30	41,96	40,30	4,09
3	41,98	40,82	38,74	40,51	4,06
4	55,70	56,90	53,57	55,39	3,05
5	54,89	57,32	52,90	55,04	4,01
6	54,16	55,41	52,35	53,97	2,85
Média	48,64	50,05	48,02		
RSD (%)	15,06	15,70	13,06		

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 17 - Estudo de repetibilidade para o experimento 13 do método com injeção múltipla.

Repetição	Área do pico 1	Área do pico 2	Área do pico 3	Área do pico 4	Área do pico 5	Área do pico 6	Média	RSD (%)
1	37,02	32,80	33,72	33,88	33,30	31,65	33,73	5,33
2	37,67	37,67	37,84	37,33	37,61	35,94	37,34	1,90
3	38,44	37,76	34,40	37,23	37,59	36,03	36,91	3,96
4	37,39	37,01	35,55	34,61	37,79	36,10	36,41	3,32
5	37,18	36,41	36,86	37,01	37,64	35,92	36,84	1,64
6	36,06	35,69	32,84	33,37	34,32	32,46	34,12	4,39
Média	37,29	36,22	35,20	35,57	36,38	34,68		
RSD (%)	2,10	5,11	5,43	5,11	5,53	5,91		

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 18 - Estudo de repetibilidade para o experimento 14 do método com injeção múltipla.

Repetição	Área do pico 1	Área do pico 2	Área do pico 3	Área do pico 4	Área do pico 5	Área do pico 6	Média	RSD (%)
1	30,89	34,29	33,52	32,53	32,40	31,04	32,45	4,12
2	32,71	33,57	31,94	30,75	31,25	29,43	31,61	4,64
3	33,29	34,34	36,41	36,55	32,60	30,65	33,97	6,73
4	20,59	23,34	23,34	23,33	23,30	18,84	22,12	8,80
5	22,82	22,83	24,33	24,08	24,61	20,54	23,20	6,50
6	22,72	24,95	26,78	26,78	27,03	19,91	24,69	11,60
Média	27,17	28,88	29,39	29,00	28,53	25,07		
RSD (%)	21,08	19,81	18,13	17,84	14,37	23,38		

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Avaliando as Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18, o ensaio 2 apresentou maior precisão entre os sinais, tanto entre os picos no mesmo eletroferograma quanto entre as repetições consecutivas. Dessa forma, as condições do ensaio 2 foram selecionadas adequadas para a análise da PQN utilizando injeção múltipla.

O método desenvolvido e otimizado possui as seguintes características: capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) com comprimento total de 33,5 cm (25,0 cm efetivo) e 50 µm d.i. x 375 µm d.e.; temperatura do capilar mantida em 25 °C, voltagem positiva de +15 kV; injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 3 s para as amostras e 50 mbar por 18 s para o BGE espaçador; BGE constituído por tampão Tris/HCl na concentração de 20/30 mmol L⁻¹ em pH 2,0; detecção em 265 nm. O condicionamento entre corridas foi estabelecido em purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto, purga de HCl 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto e purga de solução de BGE por 1 minuto.

O método desenvolvido apresenta um tempo total de análise de 11,1 min, considerando o tempo de corrida e o tempo de condicionamento entre corridas. Uma vez que seis amostras podem ser analisadas em uma única corrida, resultando em uma sextuplicata autêntica em menos de 3 min, dentro de uma hora de aplicação do método, 32 injeções podem ser realizadas.

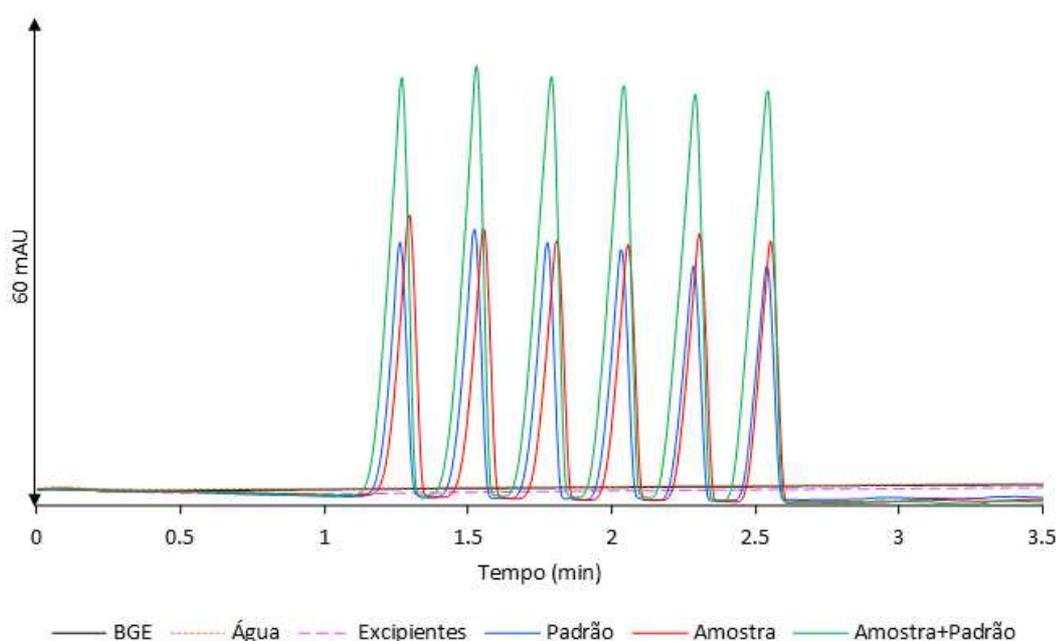
4.2.2 Validação do método analítico por injeção múltipla

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados através de ensaios com as soluções padrões e amostra (ICH, 2022; INMETRO, 2020, Brasil, 2017, Ribani et al., 2004).

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da realização de injeções do BGE, da água, dos excipientes, do padrão de PQN, da amostra, e da amostra + padrão de PQN. O padrão foi injetado na concentração de 300 mg L^{-1} de PQN, e a amostra na concentração de 315 mg L^{-1} . Na Figura 21 são apresentados os eletroferogramas para a avaliação da seletividade. Nos eletroferogramas da água, do BGE e dos excipientes não foram observados nenhum pico, enquanto que nos demais eletroferogramas há os picos referentes a PQN, a partir de 1,3 min. O método, portanto, é seletivo pois há somente o sinal referente ao fármaco desejado.

Figura 21 - Avaliação da seletividade do método com injeção múltipla.



Condições: BGE Tris/HCl $20/30 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 2,0); capilar TSP 33,5 cm (25,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +15 kV; 50 mbar x 3 s (padrão/amostra) e 50 mbar x 18 s (eletrólito espaçador); 265 nm; concentrações de 300 mg L^{-1} e 315 mg L^{-1} para o padrão e amostra, respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção da curva analítica com seis níveis de concentração, na faixa de 80 a 130% em relação a concentração do analito na amostra (Brasil, 2017, Ribani et al., 2004). A partir da solução estoque de difosfato de PQN na concentração de 1000 mg L⁻¹ foram feitas as diluições necessárias para obter as concentrações descritas na Tabela 19, cada nível em triplicata. As soluções foram injetadas e analisadas no equipamento de CE de forma aleatória. A Tabela 19 também apresenta os valores das áreas dos picos de cada réplica e de RSD. Todos os valores de RSD foram inferiores a 5% (INMETRO, 2020).

Tabela 19 - Valores de área e RSD (%) para obtenção da curva analítica da primaquina no método com injeção múltipla.

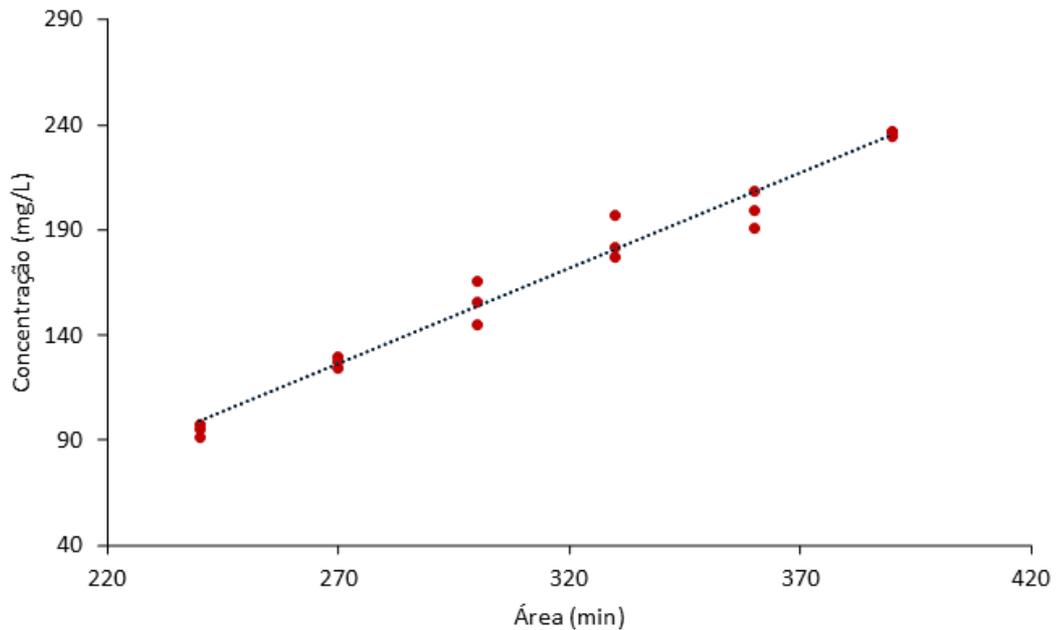
Faixa de concentração	Concentração (mg L ⁻¹)	Área	Média ± RSD (%)
80%	240	98,97	95,12 ± 3,41
		95,81	
		91,59	
90%	270	125,14	127,80 ± 1,95
		130,09	
		128,16	
100%	300	145,51	156,16 ± 6,73
		156,44	
		166,53	
110%	330	197,92	185,90 ± 5,71
		181,96	
		177,81	
120%	360	191,62	200,14 ± 4,31
		208,85	
		199,96	
130%	390	237,36	236,77 ± 0,59
		237,77	
		235,18	

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para obtenção da curva analítica, e dos valores dos coeficientes angular, linear e de correlação. A curva obtida tem equação $y = 0,9095x - 119,52$ e $r = 0,9877$. O valor do coeficiente de correlação é próximo de 1,0,

indicando que o ajuste feito pelo modelo é satisfatório. A Figura 22 ilustra a curva analítica da PQN no método de injeção com injeção múltipla.

Figura 22 - Curva analítica da primaquina no método de injeção com injeção múltipla.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O modelo de regressão proposto só pode ser utilizado se sua linearidade for verificada e se não apresentar evidências de falta de ajuste. Nesse caso, se faz necessário a realização de testes de significância da regressão e de falta de ajuste, conforme foi realizado no método com injeção pelo *outlet*. Além disso, os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência também foram avaliados. O pressuposto da independência foi satisfeito devido às soluções dos padrões terem sido injetadas 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 valor-de-p deve ser maior que 0,05. Na Tabela 20 podem ser vistos os resultados estatísticos para os testes de significância da regressão e falta de ajuste, além da verificação dos pressupostos.

Tabela 20 - Resultados estatísticos para o modelo de regressão utilizado para ajuste do modelo do método com injeção múltipla.

Falta de ajuste	F_{cal}	1,61
	F_{tab}	4,12
Significância da regressão	F_{cal}	370,08
	F_{tab}	6,12
Normalidade	valor-de-p	> 0,100
Homocedasticidade		0,461

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Observando os resultados estatísticos da Tabela 20, não há falta de ajuste no modelo à 95 % de confiança, uma vez que $F_{cal} < F_{tab}$ e o modelo apresenta uma relação linear, ou seja, regressão significativa, pois $F_{cal} > F_{tab}$. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade também foram satisfeitos pois os valores-de-pes foram maiores do que 0,05, indicando que os dados seguem uma distribuição normal e são homocedásticos.

4.2.2.3 Precisão

A repetibilidade do método foi avaliada através do RSD de seis medidas sucessivas da amostra, considerando-se a área sob os picos do analito, obtendo valor de RSD = 3,56%. A precisão intermediária foi avaliada através do RSD de doze medidas sucessivas da amostra, em termos da área do analito, em dois dias distintos, obtendo valor de RSD = 2,97%. Os valores de RSD foram inferiores a 5%, indicando que o método apresenta boa precisão (INMETRO, 2020). O preparo da amostra para a avaliação da precisão foi realizado de forma autêntica.

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através 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 80, 100 e 130% da curva analítica, que correspondem as concentrações de 240, 300 e 390 mg L⁻¹, respectivamente. Na Tabela 21 podem ser observados as porcentagens de recuperação médias. Os valores são satisfatórios e estão dentro da faixa aceitável para recuperação, 90 a 110% (ICH, 2022; INMETRO, 2020).

Tabela 21 - Porcentagem de recuperação média para a primaquina pelo método com injeção múltipla.

Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
240	101,13 ± 3,28
300	106,69 ± 5,67
390	108,29 ± 3,83

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.2.5 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados pela relação sinal/ruído. As amostras foram preparadas em sextuplicatas autênticas e o valor médio para o LD é de 0,53 mg L⁻¹, enquanto que para o LQ é de 1,77 mg L⁻¹. Ambos os valores foram menores do que as concentrações do primeiro ponto da curva, 240 mg L⁻¹, mostrando a boa sensibilidade do método.

4.2.3 Quantificação de primaquina em comprimidos

Amostras de comprimido de PQN, contendo 15 mg do princípio ativo, foram analisadas em sextuplicatas autênticas, pelo método desenvolvido e otimizado por CZE-UV com injeção múltipla, considerando o modelo de regressão implementado, discutido no item 4.2.2.2, expresso pela equação da curva $y = 0,9095x - 119,52$ e $r = 0,988$. Os resultados podem ser observados na Tabela 22. O teor encontrado de 99,81% está dentro da faixa aceitável, de 90-110%, ou seja, a massa do princípio ativo encontrada no medicamento é próxima ao valor declarado no rótulo (INMETRO, 2022).

Tabela 22 - Quantificação de primaquina em comprimidos pelo método com injeção múltipla.

Réplica	Valor encontrado (mg)	Valor declarado (mg)	Média (mg)	Teor (%)
1	15,23			
2	15,26			
3	15,05			
4	14,91	15,00	14,97	99,81
5	14,76			
6	14,61			

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE PRIMAQUINA POR CZE-UV

Os dois métodos otimizados e desenvolvidos para a determinação da primaquina foram devidamente validados e aplicados para a quantificação do fármaco em amostras de comprimidos. De forma geral, ambos mostraram que podem ser utilizados como um método de rotina para controle de qualidade do medicamento.

Pensando na frequência analítica, o método com injeção pelo *outlet* possui um tempo de migração menor para a PQN, com um tempo total de análise de 6,1 min, considerando o tempo de corrida e o tempo de condicionamento entre corridas. Dessa forma em uma hora de aplicação do método é possível realizar 9 injeções. Já no método de injeção múltipla, é possível realizar 6 injeções consecutivas da PQN, com um tempo total de análise de 11,1 min, considerando o tempo de corrida e o tempo de condicionamento entre corridas. Logo, o considerando que 6 amostras podem ser analisadas em uma única corrida, em menos de 3 min, dentro de uma hora de aplicação do método, podem ser realizadas 32 injeções, com sextuplicatas autênticas em cada corrida.

Em termos de quantificação do princípio ativo, o método com injeção múltipla foi mais exato que o método com injeção pelo *outlet*, ou seja, os resultados encontrados foram mais próximos do valor verdadeiro da concentração declarada no rótulo do comprimido. Além disso, os limites de quantificação e de detecção foram mais baixos no método com injeção múltipla, indicando que o método possui maior sensibilidade para detectar e quantificar a PQN em concentrações muito baixas.

O uso do método com injeção múltipla pode ser interessante em aplicações que demandam análises de controle de qualidade de diferentes marcas do medicamento ou até de lotes diferentes da mesma formulação. Em contrapartida, quando se deseja dosar apenas uma formulação e obter resultados mais rápidos, o método com injeção pelo outlet é uma escolha mais assertiva.

Os métodos desenvolvidos para a PQN foram publicados na forma de artigo científico na *Journal of Separation Science*, em novembro de 2024: SOUZA, J. C. Q., CHELLINI, P. R., SOUZA, M. V. N., OLIVEIRA, M. A. L. Primaquine Analysis in Pharmaceutical Formulation Using Multiple and Short-End Injections by Capillary Zone Electrophoresis-Ultraviolet Detection. *Journal of Separation Science*, v. 47, n. 22, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.70026>

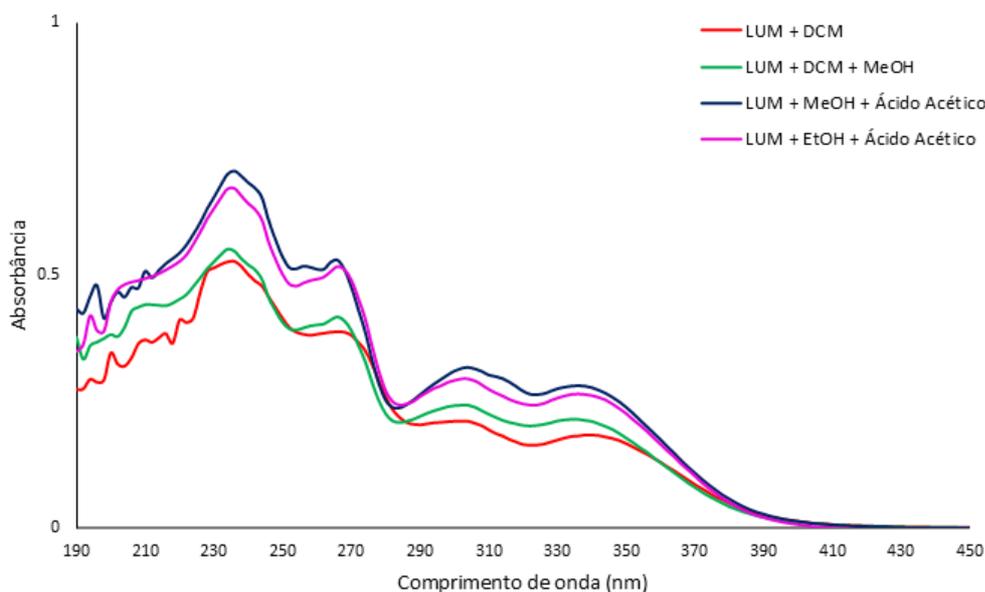
4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA E ARTEMETER POR MEECK-UV

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões referentes aos fármacos lumefantrina e artemeter.

4.4.1 Seleção do comprimento de onda e escolha do solvente

Um estudo espectrofotométrico na região UV-Vis foi realizado para selecionar o comprimento de onda mais adequado para a detecção dos analitos e para a escolha do melhor solvente.

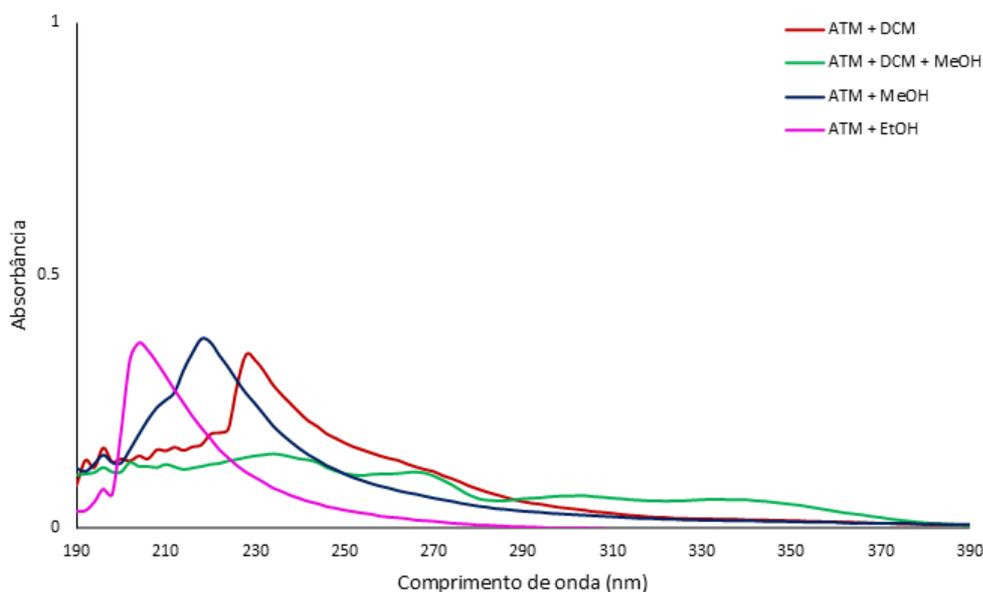
Na Figura 23 são apresentados os espectros de absorção da LUM em diferentes solventes, na concentração de 10 mg L⁻¹. A solução de LUM em DCM (linha vermelha) e em DCM + MeOH (linha verde) apresentaram menor absorção quando comparadas com as demais soluções. As soluções de LUM em MeOH + 1% ácido acético (linha azul) e de LUM em EtOH + 1% ácido acético (linha roxa) apresentaram espectros similares. A fim de minimizar o uso de solventes orgânicos sem perder informação, optou-se pelo uso do EtOH + 1% de ácido acético como solvente da LUM. Foram observados máximos de absorção nos comprimentos de onda de 235, 265 e 302 nm. O comprimento de onda escolhido foi de 235 nm, por ser mais seletivo e possuir maior absorção do que em 265 e 302 nm. A utilização de 1% de ácido acético no solvente ocorre devido a melhora na solubilização da LUM (Siqueira, 2019; César, 2009; César et al., 2008).

Figura 23 - Espectro de absorção da lumefantrina na concentração de 10 mg L⁻¹.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Na Figura 24 são apresentados os espectros de absorção do ATM em diferentes solventes, na concentração de 1000 mg L⁻¹. O ATM apresenta baixa absorvidade e por isso foi necessária uma alta concentração. A solução de ATM em DCM + MeOH (linha verde) apresentou menor absorção quando comparadas com as demais soluções. A solução de ATM em DCM (linha vermelha) apresentou máximo de absorção em aproximadamente 230 nm, enquanto que a solução de ATM em MeOH (linha azul) tem máximo de absorção em aproximadamente 220 nm, e a solução de ATM em EtOH (linha rosa) possui máximo de absorção em 200 nm. Quando há mudanças na absorção, neste caso devido aos diferentes solventes, ocorre o deslocamento para comprimentos de onda maiores, fenômeno conhecido por deslocamento batocrômico. A fim de minimizar o uso de solventes orgânicos sem perder informação, optou-se pelo uso do EtOH para solubilizar o ATM, com comprimento de onda de 200 nm.

Figura 24 - Espectro de absorção do artemeter na concentração de 1000 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.4.2 Otimização do eletrólito e das condições eletroforéticas

Devido à ausência de grupos ionizáveis na estrutura do ATM, é necessário a utilização dos modos de CE em que seja possível analisar compostos neutros, ou seja, a MEKC ou a MEEKC. A LUM é um composto altamente lipofílico e juntamente com o ATM, apresentam baixa solubilidade em solventes aquosos, mesmo na presença de tensoativos. Dessa forma, a MEEKC é uma técnica adequada para análises de compostos lipofílicos devido a utilização de uma microemulsão no BGE.

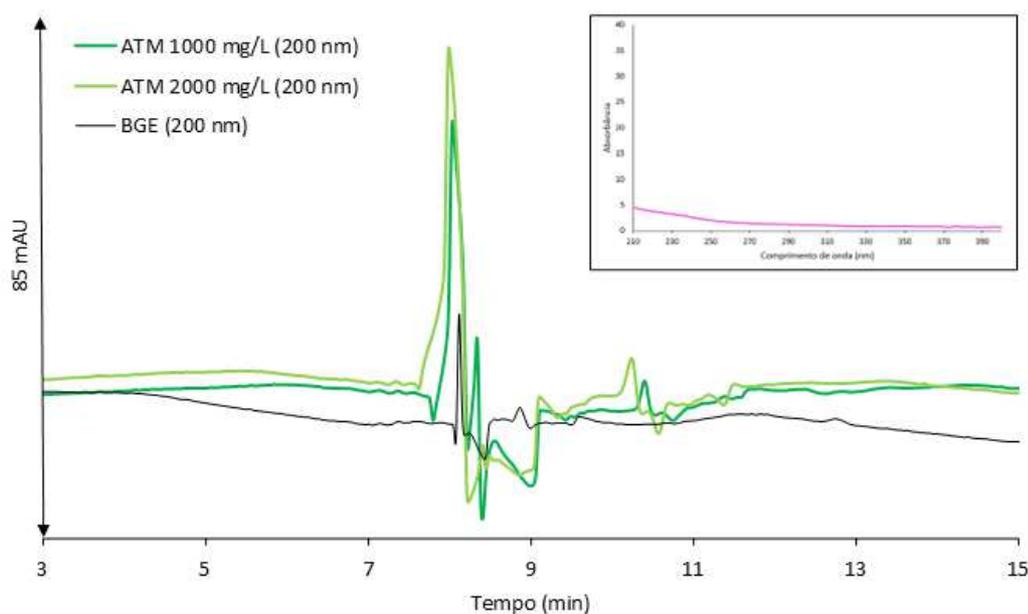
Foi proposto então testar o BGE utilizado por Yin e colaboradores (2008), constituído por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS (Yin et al., 2008). Inicialmente, foi utilizado o capilar de sílica revestido com PTFE (serie TSU) para evitar possíveis interações entre os solventes orgânicos e o revestimento de poli(imida). As demais condições instrumentais foram: capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm efetivo) 75 µm d.i. x 375 µm d.e., 25 °C, +20 kV, 25 mbar por 5 s, condicionamento entre as análises com purga de NaOH por 2 minutos, purga de água por 2 minutos e purga de BGE por 2 minutos. A solução estoque do padrão de ATM foi preparada em EtOH na concentração de 5000 mg L⁻¹ e diluída, em BGE, para duas concentrações, 1000 e 2000 mg L⁻¹, para confirmação do sinal. A solução estoque do padrão de LUM foi preparada em EtOH + 1% ácido acético, na concentração de 1000 mg L⁻¹ e diluída, em BGE, para

500 mg L⁻¹ e o sinal foi confirmado pela comparação do espectro UV obtido no equipamento de CE com o espectro UV obtido no espectrofotômetro.

As soluções foram injetadas individualmente e posteriormente foi preparada uma solução mistura padrão com os dois fármacos nas concentrações previamente descritas. Nas Figuras 25, 26 e 27 podem ser observados todos os eletroferogramas obtidos, assim como os espectros de absorção dos analitos.

Pela Figura 25, o ATM na concentração de 1000 mg L⁻¹, em 200 nm, possui uma área de 27,3140 min e tempo de migração de 10,56 min. Ao aumentar a concentração para 2000 mg L⁻¹, a área atinge o valor de 62,7903 min e o tempo de migração é de 10,25 min. Logo, através do aumento da área do pico, é possível afirmar que o sinal é observado é referente ao ATM.

Figura 25 - Eletroferogramas do artemeter nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ (linha verde escuro) e de 2000 mg L⁻¹ (linha verde claro) e espectro UV.

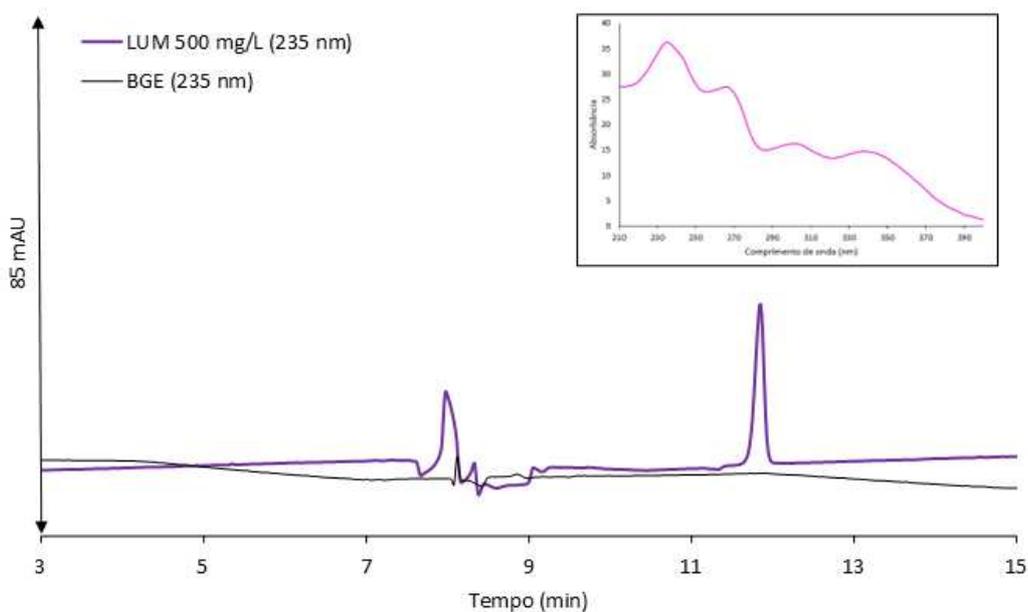


Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.; 25°C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 nm; solubilizado em EtOH e diluído em BGE.
Elaborada pela autora (2024).

Pela Figura 26, a LUM na concentração de 500 mg L⁻¹, em 235 nm, possui uma área de 207,3550 min e tempo de migração de 11,86 min. Ao comparar o espectro UV obtido pelo equipamento de CE com o espectro UV obtido pelo espectrofotômetro (Figura 23), é possível

observar que são idênticos, afirmando que o sinal observado no eletroferograma é referente a LUM.

Figura 26 - Eletroferogramas da lumefantrina na concentração de 500 mg L⁻¹ e espectro UV.

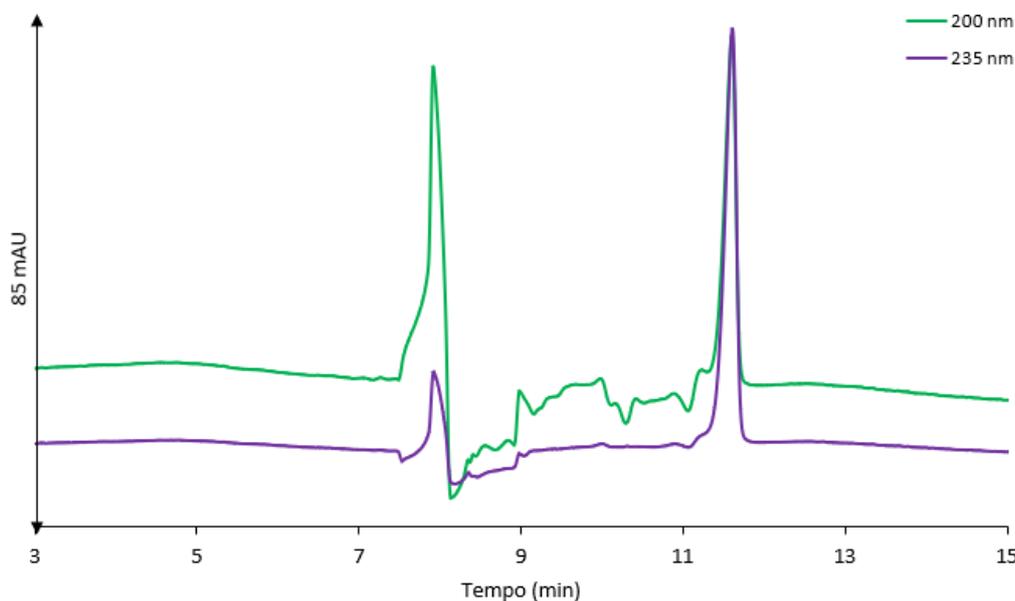


Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x 75 μm d.i.; 25°C; +20 kV; 25 mbar x 5s (amostra e BGE); 235 nm; solubilizada em EtOH + 1% ácido acético e diluído em BGE.

Elaborada pela autora (2024).

Pela Figura 27, era esperado observar um sinal próximo de 10 min que seria referente ao ATM e outro sinal próximo de 12 min referente a LUM. Entretanto, na mistura de padrões não foi possível identificar o sinal referente ao ATM. Uma possível causa para tal fato é a concentração de LUM estar muito alta comparada a concentração do ATM, o que influencia na visualização do sinal do ATM devido a LUM ter maior absorvância do que o ATM. Os próximos passos foram realizados com o intuito de melhorar o sinal do ATM.

Figura 27 - Eletroferograma da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ para o artemeter e 500 mg L⁻¹ para a lumefantrina.



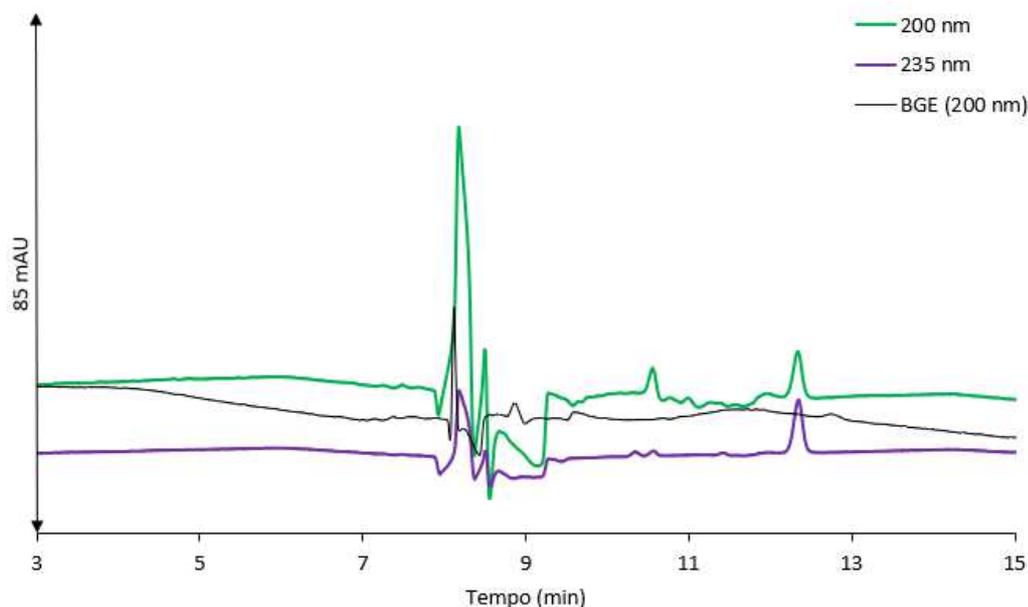
Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x 75 µm d.i.; 25°C; +20 kV; 25 mbar x 5s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM solubilizado em EtOH, LUM solubilizada em EtOH + 1% ácido acético e ambos diluídos em BGE. Elaborada pela autora (2024).

Nesse sentido, foi preparada e injetada uma nova mistura de padrões, com as concentrações de 1000 mg L⁻¹ para ATM e de 50 mg L⁻¹ para a LUM. Ao injetar a LUM separadamente, foi observado um sinal semelhante a Figura 26, mas de menor área e intensidade, como era esperado.

Na Figura 28 é possível observar os eletroferogramas da mistura de padrões nos comprimentos de onda de 200 nm e 235 nm. O ATM na concentração de 1000 mg L⁻¹, em 200 nm, possui área de 29,4302 min e tempo de migração de 10,557 min, enquanto que a LUM na concentração de 50 mg L⁻¹, em 235 nm, possui uma área de 67,9857 min e tempo de migração de 12,34 min.

Dessa forma, as condições instrumentais consistem em capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e., temperatura de 25 °C, voltagem positiva de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s, e detecção em 200 nm e 235 nm. O condicionamento entre corridas foi realizado com purga de NaOH, água e BGE por 2 minutos cada. O BGE é composto por 20 mmol L⁻¹ de tampão borato (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS.

Figura 28 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L^{-1} para o artemeter e 50 mg L^{-1} para a lumefantrina.

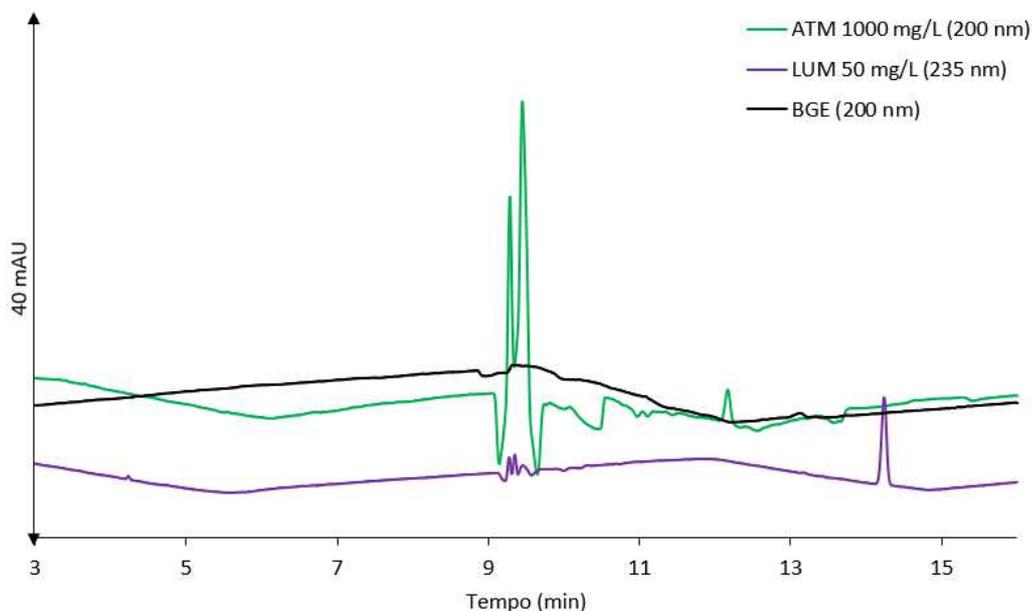


Condições: BGE composto por 20 mmol L^{-1} de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x $75 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM solubilizado em EtOH, LUM solubilizada em EtOH + 1% ácido acético e ambos diluídos em BGE. Elaborada pela autora (2024).

A fim de avaliar a influência do diâmetro do capilar no tempo de migração, foi realizada a troca do diâmetro interno do capilar de $75 \mu\text{m}$ para $50 \mu\text{m}$. Para verificar o comportamento dos analitos nessa nova condição, foram injetadas novamente as soluções dos analitos, diluídas em BGE, nas concentrações de 1000 mg L^{-1} de ATM e de 50 mg L^{-1} de LUM. Na Figura 29 são apresentados os eletroferogramas dos analitos injetados separadamente, e na Figura 30 pode ser observado o eletroferogramas da mistura de padrões.

Pela Figura 29, o sinal do ATM na concentração de 1000 mg L^{-1} em 200 nm e no capilar de TSU $50 \mu\text{m}$, possui uma área de 12,2948 min e tempo de migração de 12,16 min. Já o sinal da LUM na concentração de 50 mg L^{-1} , em 235 nm e no capilar de TSU $50 \mu\text{m}$, possui uma área de 31,3044 min e tempo de migração de 14,23 min. Para ambos os analitos foram observados diminuição na área e aumento no tempo de migração quando comparados com os resultados obtidos no capilar TSU $75 \mu\text{m}$.

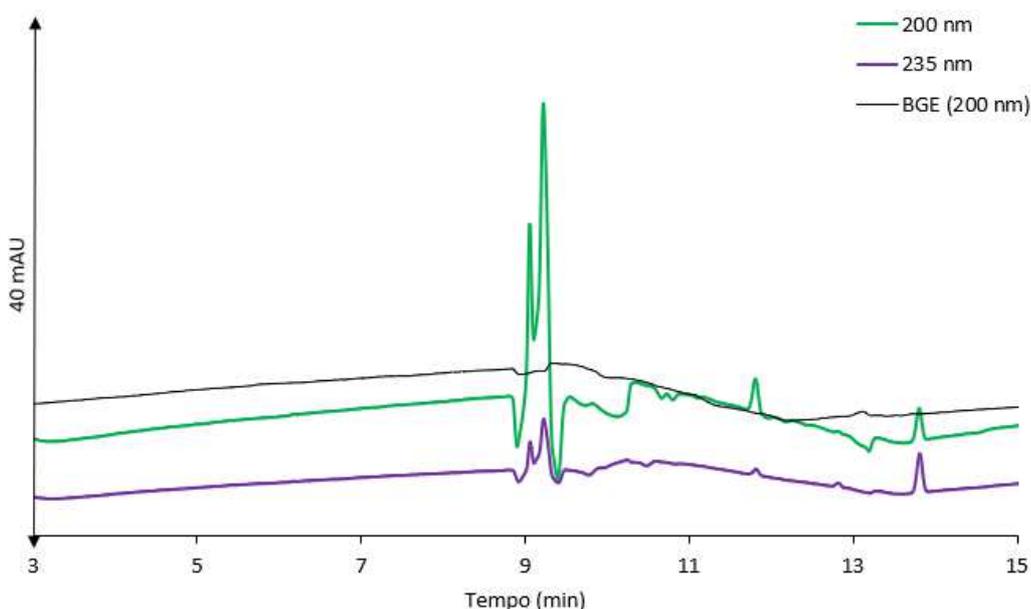
Figura 29 - Eletroferogramas do artemeter na concentração de 1000 mg L^{-1} e da lumefantrina na concentração de 50 mg^{-1} , no capilar de $50 \mu\text{m}$.



Condições: BGE composto por 20 mmol L^{-1} de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM solubilizado em EtOH, LUM solubilizada em EtOH + 1% ácido acético e ambos diluídos em BGE. Elaborada pela autora (2024).

Para a mistura de padrões, na Figura 30, o sinal do ATM possui área de 12,4281 min e tempo de migração de 11,81 min, e o sinal da LUM possui área de 13,808 min e tempo de migração de 13,81 min. Foi percebido uma diminuição do sinal da LUM.

Figura 30 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L^{-1} para artemeter e 50 mg L^{-1} para lumefantrina, no capilar de $50 \mu\text{m}$.



Condições: BGE composto por 20 mmol L^{-1} de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSU 48,5 cm (40,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE.

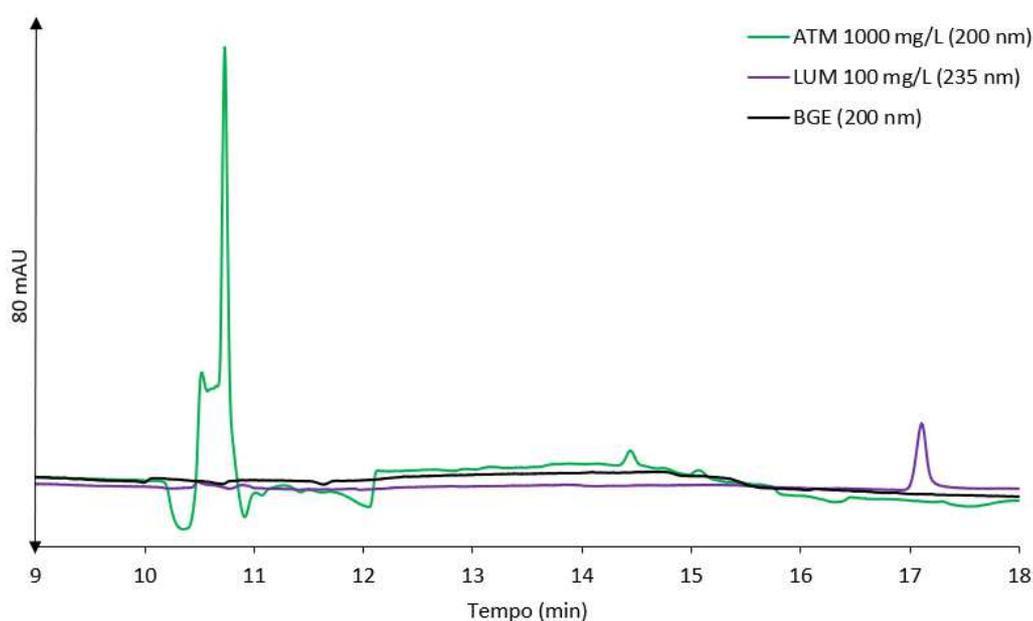
Elaborada pela autora (2024).

Até o momento, estava sendo utilizado o capilar TSU de $50 \mu\text{m}$. Entretanto, foi observado durante as análises que esse capilar estava sofrendo quebras constantes, ocasionando oscilação na corrente. Por esse motivo, optou-se por continuar o desenvolvimento do método com o capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (série TSP) de $50 \mu\text{m}$. Apesar dos valores de área e tempo de migração tenham sido melhores no capilar de $75 \mu\text{m}$, não foi possível utilizar o capilar TSP de $75 \mu\text{m}$ por não estar disponível para uso no laboratório no período em que o projeto estava sendo desenvolvido. Nessa etapa do desenvolvimento do método, optou-se por preparar uma nova solução estoque de ATM utilizando o mesmo solvente da LUM, ou seja, o padrão foi solubilizado em EtOH + 1% de ácido acético. Essa mudança foi necessária devido ao preparo da amostra, que será relatado nas próximas páginas.

Nesse contexto, por ter mudado novamente o capilar, os padrões foram injetados individualmente, bem como a mistura de padrões, a fim de confirmar seus comportamentos no novo capilar. Na Figura 31 são apresentados os eletroferogramas dos padrões individuais e na Figura 32 é possível observar os eletroferogramas da mistura de padrões no capilar TSP de $50 \mu\text{m}$.

Pela Figura 31, o sinal do ATM na concentração de 1000 mg/L, em 200 nm e no capilar de TSP 50 μm , possui uma área de 12,5801 min e tempo de migração de 14,44 min. Já o sinal da LUM na concentração de 100 mg/L, em 235 nm e no capilar de TSP 50 μm , possui uma área de 72,4597 min e tempo de migração de 17,11 min. É importante ressaltar o aumento no tempo de migração de ambos os analitos nesse capilar. Já na mistura de padrões, Figura 32, observamos o mesmo comportamento, com valores de área e tempo de migração similares.

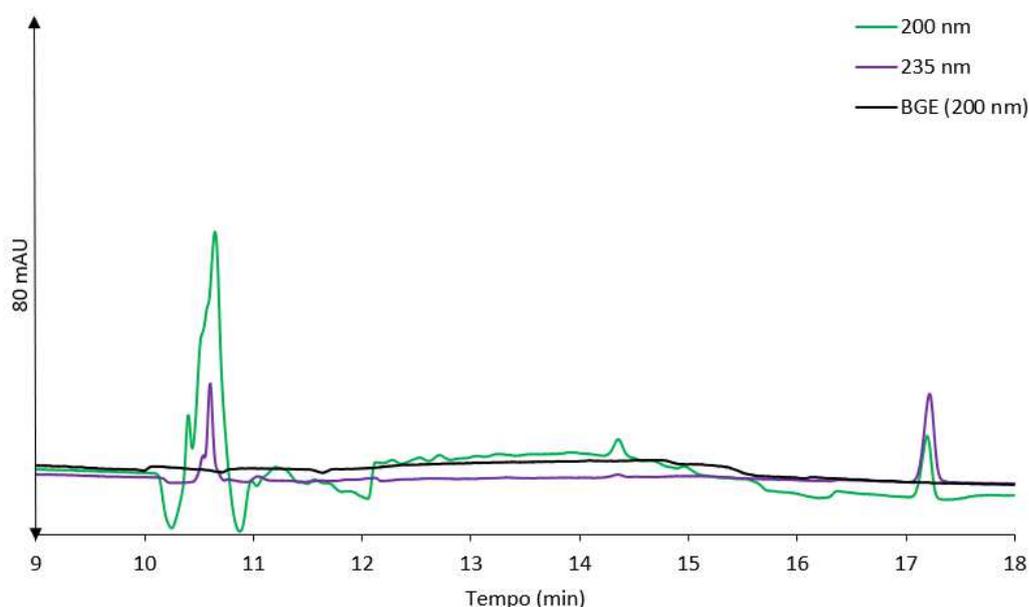
Figura 31 - Eletroferogramas do artemeter na concentração de 1000 mg L⁻¹ e da lumefantrina na concentração de 100 mg L⁻¹, no capilar TSP de 50 μm .



Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 μm d.i.; 25 °C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE.

Elaborada pela autora (2024).

Figura 32 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ para artemeter e 100 mg L⁻¹ para lumefantrina, no capilar de 50 µm.



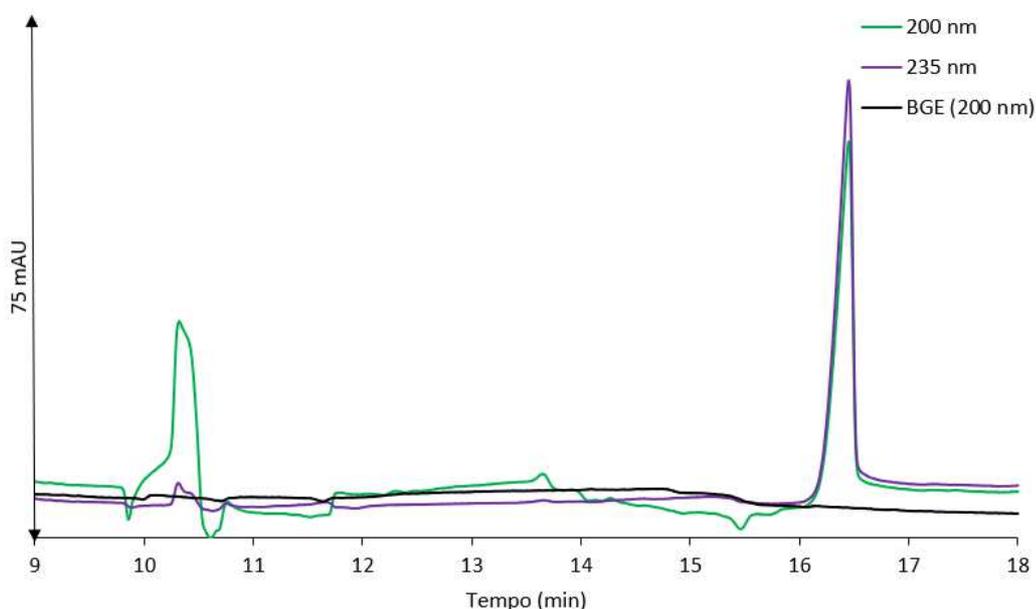
Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 µm d.i.; 25 °C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE.

Elaborada pela autora (2024).

Com a definição do capilar, foi realizado o estudo do perfil de separação dos analitos na amostra. Dessa forma os comprimidos de 2-FDC contendo 20 mg de ATM e 120 mg de LUM foram preparados conforme descrito na seção 3.2.3. A amostra foi preparada em EtOH + 1% ácido acético, posteriormente diluída em BGE na concentração de 1000 mg L⁻¹ de ATM, estocada em freezer.

Na Figura 33 podem ser observados os eletroferogramas da amostra nos comprimentos de onda de 200 e 235 nm. Pela Figura 33, o sinal do ATM na concentração de 1000 mg L⁻¹, em 200 nm, possui uma área de 10,6026 min e tempo de migração de 13,65 min. Já o sinal da LUM na concentração de 60000 mg L⁻¹, em 235 nm, possui uma área de 629,407 min e tempo de migração de 16,45 min.

Figura 33 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ para artemeter e 6000 mg L⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE.



Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 µm d.i.; 25 °C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE.
Elaborada pela autora (2024).

A fim de melhorar o sinal do ATM, foram realizadas análises da amostra, na concentração de 1000 mg L⁻¹ de ATM, em diferentes solventes (Yu et al., 2012), que são: em BGE, em EtOH, em TBS 10 mmol L⁻¹, em TBS 10 mmol L⁻¹ + 10% EtOH, em TBS 10 mmol L⁻¹ + 10% ACN, em TBS 20 mmol L⁻¹, em TBS 20 mmol L⁻¹ + 10% EtOH, e em TBS 20 mmol L⁻¹ + 10% ACN.

Nas Figuras 33 (BGE) e 34 podem ser observados os eletroferogramas da amostra de 2-FDC diluída em diferentes solventes para injeção no equipamento de CE. Todas as injeções foram feitas na mesma concentração de 1000 mg L⁻¹ de ATM e 6000 mg L⁻¹ de LUM. Na Tabela 23 é possível verificar os valores de área e de tempo de migração para os analitos, nos seus respectivos comprimentos de onda, em diferentes solventes.

Tabela 23 - Valores de área e tempo de migração para o artemeter e a lumefantrina em diferentes solventes.

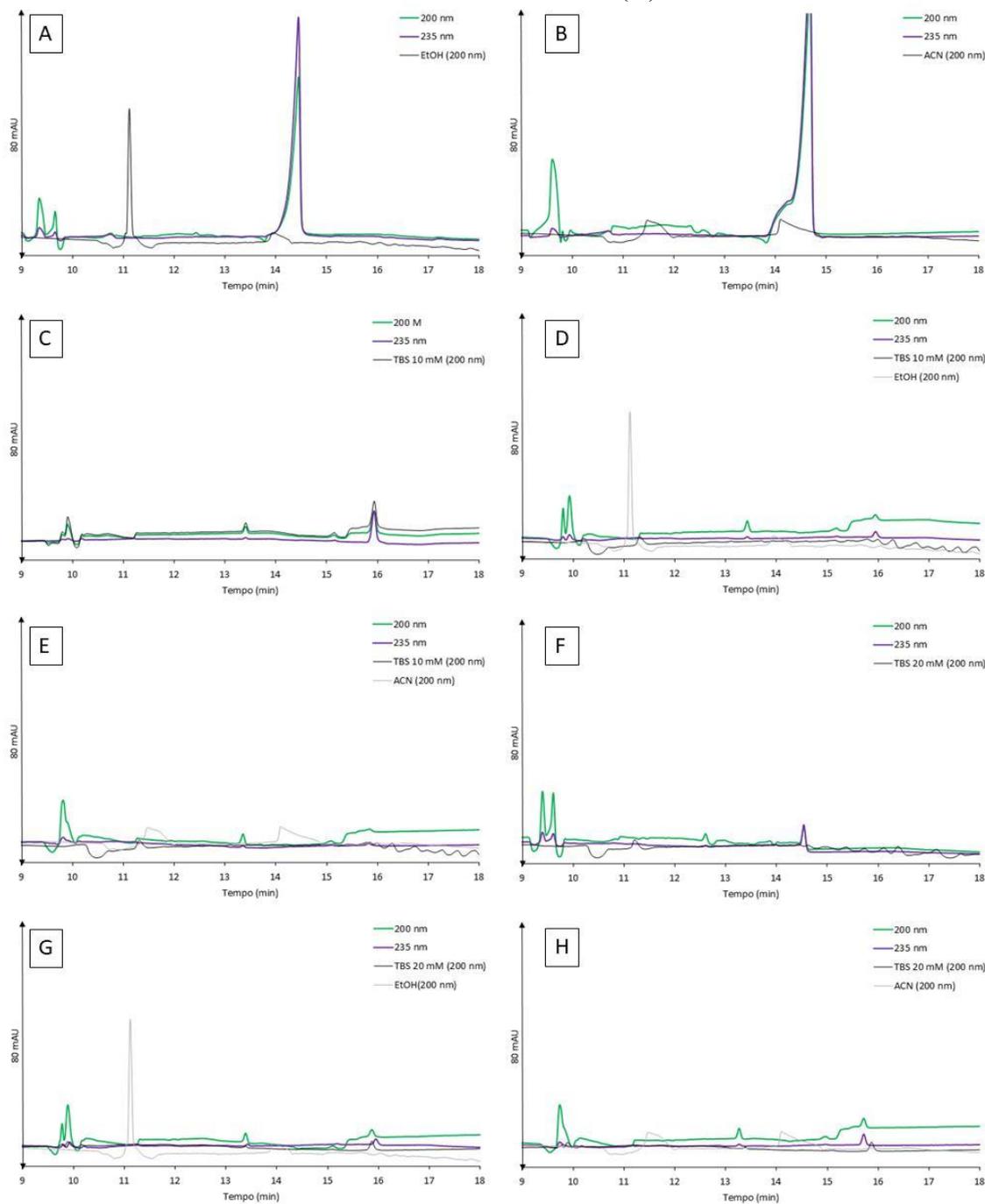
Solvente	Área ATM (min) ^a	Tempo de migração ATM (min) ^a	Área LUM (min) ^b	Tempo de migração LUM (min) ^b
BGE	10,6026	13,65	629,407	16,45
EtOH	4,1283	12,717	1027,14	15,138
ACN	3,9927	12,33	968,114	14,678
TBS 10 mmol L ⁻¹	9,43085	13,40	64,3484	15,935
TBS 10 mmol L ⁻¹ + 10% EtOH	15,181	13,42	10,018	15,948
TBS 10 mmol L ⁻¹ + 10% ACN	15,169	13,35	-	-
TBS 20 mmol L ⁻¹	13,4071	12,61	33,4504	14,539
TBS 20 mmol L ⁻¹ + 10% EtOH	13,5419	13,386	18,4237	15,87
TBS 20 mmol L ⁻¹ + 10% ACN	14,6308	13,266	17,4971	15,716

^a dados em 200 nm; ^b dados em 235 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Analisando a Tabela 23, mesmo que a área da LUM tenha aumentado em EtOH e ACN, não é viável trabalhar com esses solventes, visto que a área do ATM sofre uma diminuição. Já para quando são utilizados o TBS nas concentrações de 10 e 20 mmol L⁻¹, há um aumento no sinal do ATM, mas uma diminuição drástica no sinal da LUM, o que também não é favorável. Dessa forma, optou-se por continuar com a diluída em BGE. Além disso, ao adicionar o TBS na amostra, a nova solução fica com aspecto turvo, e há precipitação da amostra.

Figura 34 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L^{-1} para artemeter e 6000 mg L^{-1} para lumefantrina, diluída em EtOH (A), em ACN (B), em TBS 10 mmol L^{-1} (C), em TBS $10 \text{ mmol L}^{-1} + 10\% \text{ EtOH}$ (D), em TBS $10 \text{ mmol L}^{-1} + 10\% \text{ ACN}$ (E), em TBS 20 mmol L^{-1} (F), em TBS $20 \text{ mmol L}^{-1} + 10\% \text{ EtOH}$ (G), e em TBS $20 \text{ mmol L}^{-1} + 10\% \text{ ACN}$ (H).



Condições: BGE composto por 20 mmol L^{-1} de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x $50 \mu\text{m}$ d.i.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE.

Elaborada pela autora (2024).

Com a amostra diluída em BGE, foi realizado um estudo de repetibilidade com diferentes sequências de condicionamentos entre corridas, a fim de verificar a precisão do método. Nesse sentido, a amostra foi preparada e injetada três vezes consecutivas, utilizando o mesmo BGE para as análises. Os valores médios das áreas dos sinais dos fármacos, bem como o valor médio do tempo de migração podem ser verificados a Tabela 24. Foram realizadas as seguintes sequências de condicionamentos entre corridas:

- 1) 1 min NaOH, 1 min H₂O, 1 min BGE;
- 2) 2 min NaOH, 2 min H₂O, 2 min BGE;
- 3) 3 min NaOH, 3 min H₂O, 3 min BGE;
- 4) 1 min NaOH, 1 min H₂O, 1 min EtOH, 1 min H₂O, 2 min BGE;
- 5) 1 min NaOH, 1 min H₂O, 1 min ACN, 1 min H₂O, 2 min BGE;

Tabela 24 - Valores de área média e tempo de migração médio, associados aos seus RSD, para o artemeter e lumefantrina, em diferentes condicionamentos entre corridas.

		Área ATM (min) ^a	Tempo de migração ATM (min) ^a	Área LUM (min) ^b	Tempo de migração LUM (min) ^b
Condicionamento entre corridas 1	Valor médio	12,01	11,08	179,00	12,96
	RSD	5,134	1,3177	2,2124	1,3542
Condicionamento entre corridas 2	Valor médio	14,202	10,926	270,678	12,778
	RSD	16,2494	0,4825	18,4850	0,4936
Condicionamento entre corridas 3	Valor médio	13,433	10,919	260,782	12,736
	RSD	7,4820	0,1614	12,4087	0,1962
Condicionamento entre corridas 4	Valor médio	13,213	10,763	361,084	12,533
	RSD	13,2494	0,2547	15,5118	0,3746
Condicionamento entre corridas 5	Valor médio	13,168	10,429	269,638	11,821
	RSD	19,0261	0,2136	18,6789	0,2263

^a dados em 200 nm; ^b dados em 235 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O condicionamento entre corridas 1 (1 min NaOH, 1 min H₂O, 1 min BGE) foi aquele que teve menor variação, com menores valores de RSD para as áreas dos sinais. Dessa forma, essa condição foi escolhida para continuar o desenvolvimento do método.

Entretanto, ao fazer um novo estudo de repetibilidade com o condicionamento entre corrida 1, por dez vezes consecutivas, as variações das áreas ficaram com RSD acima de 10%, como pode ser observado na Tabela 25. Nesse teste, o mesmo eletrólito foi utilizado para a aplicação de voltagem em todas as 10 repetições.

Tabela 25 - Valores de área e tempo de migração para cada repetição, e valores médios de área e tempo de migração, e RSD, para o artemeter e a lumefantrina, diluídos em BGE, utilizando o condicionamento entre corridas 1.

Repetição	Área ATM (min) ^a	Tempo de migração ATM (min) ^a	Área LUM (min) ^b	Tempo de migração LUM (min) ^b
1	10,8445	10,4210	80,0429	11,7320
2	11,7126	10,2720	77,0181	11,5640
3	11,1855	10,1970	87,0904	11,4890
4	11,6301	10,1700	89,9300	11,4690
5	14,7874	10,1410	113,0080	11,4470
6	12,7475	10,1210	178,6450	11,4300
7	12,0435	10,0980	113,6550	11,4050
8	10,9839	10,0640	132,1000	11,3690
9	10,1194	10,0790	128,8300	11,3850
10	11,7021	10,0670	154,4060	11,3720
Média	11,78	10,16	115,47	11,47
RSD	10,8541	1,0986	29,1009	0,9689

^a dados em 200 nm; ^b dados em 235 nm.

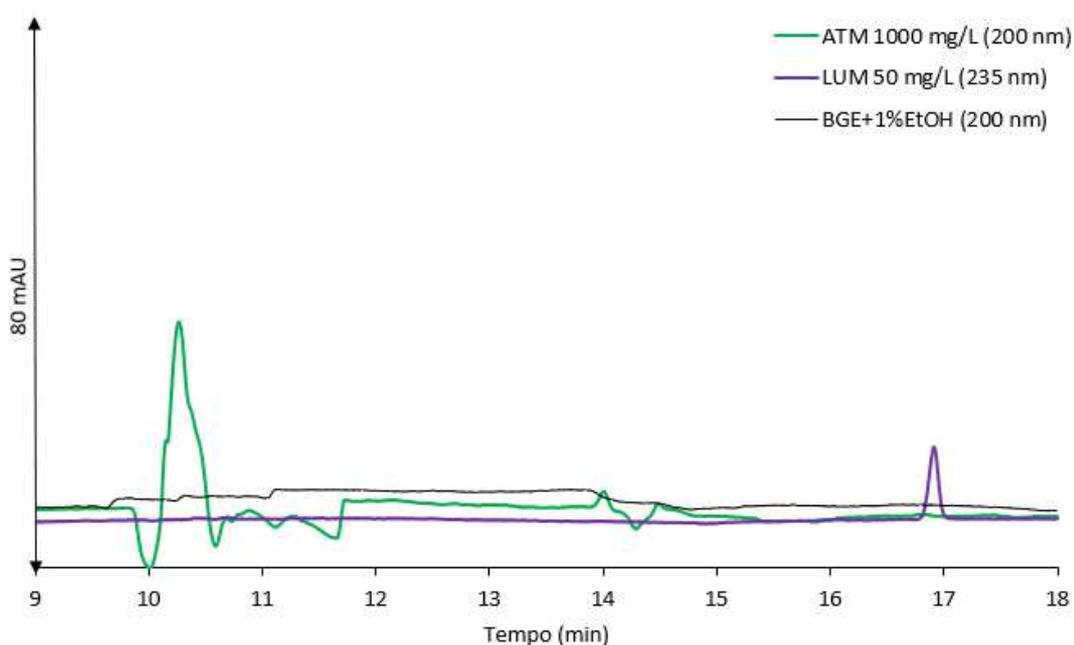
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A variação na área indica que é necessário trocar o eletrólito em toda corrida, ou a cada 3 corridas (RSD = 3,89% para área do ATM e RSD = 6,35% para a área do LUM, para três corridas). Entretanto, trocar o eletrólito a cada corrida fica inviável do ponto de visto de posições no carrossel (nesse caso, 48 posições). Outra opção seria utilizar o sistema de *replenishment*, porém o BGE é composto por surfactante e TBS, que a longo prazo, pode causar entupimento nos tubos e, conseqüentemente, o mal funcionamento do equipamento. Além disso, acarretaria um tempo extra de limpeza dos tubos, o que aumentaria o tempo de análise, uma vez que é necessário despressurizar todo o sistema para repor as garrafas de *replenishment*.

Logo, optou-se por testar uma nova condição de solvente para diluir amostra para injeção: BGE + 1% de ácido acético. Essa condição é semelhante ao preparo dos padrões e da amostra, entretanto é feito com EtOH. A justificativa de adicionar o ácido acético é melhorar a solubilidade dos fármacos frente aos excipientes do comprimido. Nas Figuras 35 e 36 podem ser observados os eletroferogramas das injeções dos padrões e da amostra diluídos em BGE + 1% de ácido acético, respectivamente.

Pela Figura 35, o sinal do ATM na concentração de 1000 mg L⁻¹, em 200 nm, possui uma área de 14,4014 min e tempo de migração de 14,004 min. Já o sinal da LUM na concentração de 50 mg L⁻¹, em 235 nm, possui uma área de 63,0702 min e tempo de migração de 16,91 min.

Figura 35 - Eletroferogramas da mistura de padrões nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ para artemeter e 50 mg L⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE + 1% de ácido acético.

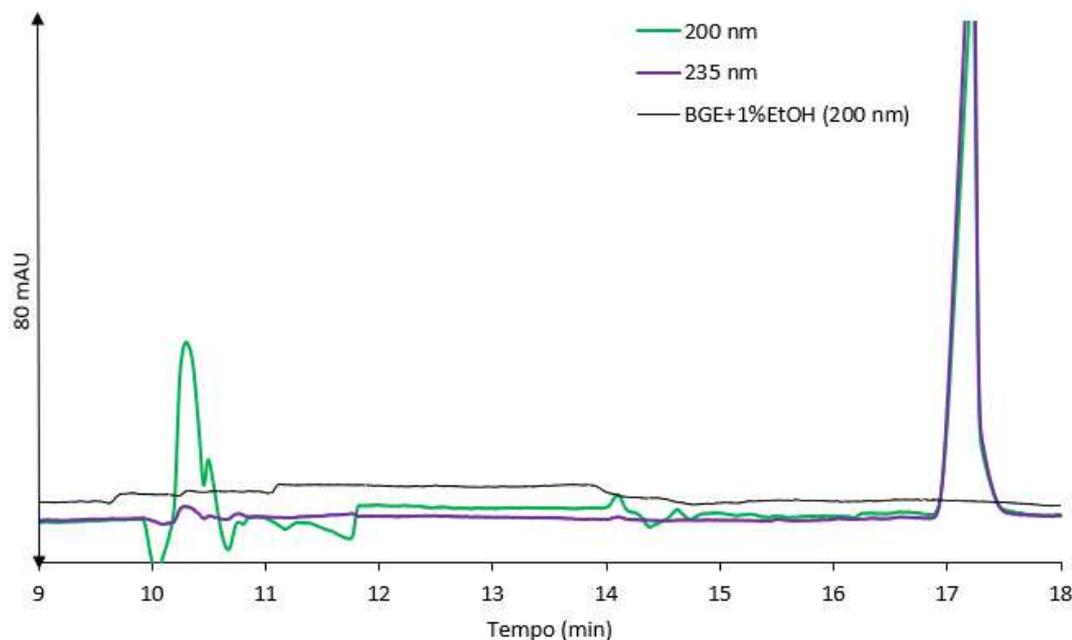


Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 µm d.i.; 25 °C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE + 1% ácido acético.

Elaborada pela autora (2024).

Pela Figura 36, o sinal do ATM na concentração de 1000 mg/L, em 200 nm, possui uma área de 12,1869 min e tempo de migração de 14,097 min. Já o sinal da LUM na concentração de 6000 mg/L, em 235 nm, possui uma área de 1076,4 min e tempo de migração de 17,219 min.

Figura 36 - Eletroferogramas da amostra de comprimidos 2-FDC nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ para artemeter e 6000 mg L⁻¹ para lumefantrina, diluída em BGE + 1% de ácido acético.



Condições: BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; capilar TSP 48,5 cm (40,0 cm) x 50 µm d.i.; 25 °C; +20 kV; 25 mbar x 5 s (amostra e BGE); 200 e 235 nm; ATM e LUM solubilizados em EtOH + 1% ácido acético e diluídos em BGE + 1% ácido acético.
Elaborada pela autora (2024).

Dessa forma, uma nova solução amostras foi diluída, em BGE + 1% ácido acético, e injetada por 10 vezes consecutivas, ainda utilizando o mesmo eletrólito para todas as análises. Pelos eletroferogramas, podemos observar que houve um pequeno aumento no sinal da LUM, e o do ATM permaneceu sem muitas alterações. Além disso, houve um aumento do tempo de migração para ambos os fármacos. Porém, mesmo com o aumento do tempo de migração, essa condição se mostrou promissora devido ao baixo RSD das áreas dos sinais mesmo sem trocar o eletrólito a cada uma ou três corridas. Na Tabela 26 podem ser observados os valores das áreas dos sinais dos fármacos, os valores dos tempos de migração, bem como os valores médios de cada parâmetro, considerando 10 injeções consecutivas.

Tabela 26 - Valores de área e tempo de migração para cada repetição, e valores médios de área e tempo de migração, e RSD, para o artemeter e a lumefantrina, diluídos em BGE + 1% ácido acético, utilizando o condicionamento entre corridas 1.

Repetição	Área ATM (min) ^a	Tempo de migração ATM (min) ^a	Área LUM (min) ^b	Tempo de migração LUM (min) ^b
1	12,9300	14,5400	1301,1600	17,7810
2	14,8335	14,3900	1265,9400	17,6090
3	14,0305	14,3240	1274,2800	17,5750
4	14,2766	14,1720	1321,9700	17,3820
5	14,2648	14,1020	1263,5700	17,2700
6	14,3049	14,0720	1242,1700	17,2690
7	14,5614	14,0450	1166,2500	17,2250
8	13,6775	13,7820	1157,7200	16,8470
9	12,7695	13,7500	1238,0000	16,7880
10	12,6092	13,7440	1122,2800	16,7460
Média	13,83	14,09	1235,33	17,25
RSD	5,7279	1,9600	5,3097	2,0859

^a dados em 200 nm; ^b dados em 235 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Avaliando os resultados de área do sinal, ao considerarmos as seis primeiras corridas, temos valores de RSD de 4,49% para o ATM e RSD = 2,25% para a LUM. Isso indica que o eletrólito pode ser usado por 6 corridas sem que a repetibilidade seja afetada, uma vez que pequenas variações no pH ou na concentração dos componentes podem ocasionar mudanças na área e no tempo de migração, devido a aplicação da voltagem em toda corrida.

O método desenvolvido e otimizado possui as seguintes características: capilar de sílica fundida revestido externamente com poli(imida) (serie TSP) com comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm efetivo) e 50 µm d.i. x 375 µm d.e.; temperatura do capilar mantida em 25 °C, voltagem positiva de +20 kV; injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s para a amostra e BGE; BGE constituído por 20 mmol L⁻¹ de TBS (pH 8,7), 18% v/v de acetonitrila, 0,8% v/v de hexano, 21% v/v de 1-butanol e 1,2% v/v de SDS; detecção em 200 e 235 nm. O condicionamento entre corridas foi estabelecido em purga de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 1 minuto, purga de água deionizada por 1 minuto, purga de solução de BGE por 1 minuto. O solvente da amostra consiste

em EtOH + 1% de ácido acético e é diluída, para injeção no equipamento de CE, em BGE + 1% de ácido acético.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O doseamento dos fármacos utilizados no tratamento da Malária possui uma grande importância para o monitoramento terapêutico e na garantia da qualidade das formulações farmacêuticas disponibilizadas para a população. A administração de uma dose incorreta desses medicamentos oferece riscos ao paciente, como o aumento nos efeitos colaterais, na toxicidade, e ocasionando uma ineficácia terapêutica, além de contribuir para a resistência do parasita. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos que sejam simples, rápidos e que estejam em concordância com a Química verde são essenciais para o controle de qualidade em análises de rotina, visando, a longo prazo, combater o aumento dos casos da doença no país.

Dessa forma, foi desenvolvido, otimizado e validado um método analítico para a determinação de primaquina em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar de zona com detecção por UV e com injeção pelo *outlet*, resultando em um tempo de migração de 0,6 minutos. Durante a otimização foi utilizado o planejamento fatorial 3^2 para encontrar as condições instrumentais mais favoráveis para uma boa resolução do pico. 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 RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA. O método foi aplicado em comprimidos de primaquina, sendo obtido teor de 94,90 %.

Em seguida, foi desenvolvido, otimizado e validado um método analítico para a determinação de primaquina em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar de zona com detecção por UV e com injeção múltipla, totalizando uma sextuplicata autêntica. Durante a otimização foi utilizado o planejamento Box-Behnken 3^3 para encontrar as condições instrumentais mais adequadas para boas resoluções dos picos consecutivos. Em seguida, o método também foi validado conforme o método anterior, e todos os resultados se mostraram satisfatórios, dentro dos limites preconizados pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA. O método foi aplicado em comprimidos de primaquina, obtendo teor de 99,81 %.

Além da primaquina, a associação artemeter-lumefantrina também foi estudada, considerando que formulações farmacêuticas que possuem dois ou mais fármacos em proporções fixas são produtos que trazem desafios para a indústria farmacêutica, uma vez que é necessário garantir a qualidade, sem afetar o tratamento. No caso de comprimidos de dose fixa combinada, a maior dificuldade analítica se encontra na quantificação simultânea dos fármacos, visando o controle de qualidade do teor do produto acabado.

Nesse contexto, foi realizado o desenvolvimento e otimização de um método analítico por cromatografia eletrocinética em microemulsão com detecção UV para a determinação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimido de dose fixa combinada. A baixa solubilidade e a alta lipofilicidade dos fármacos são os principais aspectos desafiadores para implementação de um método de doseamento.

As perspectivas futuras envolvem a otimização de um método analítico por cromatografia eletrocinética em microemulsão utilizando o detector por condutividade (C⁴D) para o doseamento de artemeter e lumefantrina, além da aplicação dos métodos propostos em amostras de plasma humano, como forma de obter métodos bioanalíticos.

REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K.; MAHUZIER, P. E.; CLARK, B. J. Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 24, p. 315-324, 2003
- AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. CAS SciFinder: Primaquine, Artemether, Lumefantrine. Disponível em: <https://scifinder-n.cas.org/>. Acesso em: 10 abr 2024.
- AMIN, N. C.; BLANCHIN, M. D.; AKE, M.; MONTELS, J.; FABRE, H. Capillary electrophoresis methods for the analysis of antimalarials. Part II. Achiral separative methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1276, p. 1-11, 2013a.
- AMIN, N. C.; FABRE, H.; BLANCHIN, M. D.; MONTELS, J.; AKÉ, M. Determination of artemether and lumefantrine in anti-malarial fixed-dose combination tablets by microemulsion electrokinetic chromatography with short-end injection procedure. **Malaria Journal**, 2013b.
- AMINI, A.; LODEN, H.; PETTERSSON, C.; ARVIDSSON, T. Principles for different modes of multiple-injection CZE. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3952-3958, 2008.
- BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. Techniques in Analytical Chemistry Series. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4a ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 7a ed. vol. 2. Brasília: 2024c.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 53, de 4 de dezembro de 2015. **Notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 07 de dezembro de 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. **Validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 24 de julho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**, vol. 2, p. 921-953, 6a ed. rev. Brasília, 2024b.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Tratamento da Malária no Brasil** (Série A Normas e Manuais Técnicos), 2a ed. at. Brasília, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária** (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2a ed. Brasília, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária de A a Z: Situação Epidemiológica da Malária**. Brasília, 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria>. Acesso em: 20 dez 2024.

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.

BUCHBERGER, W. Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *In*: SCHMITT-KOPPLIN, P. **Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols**. 2nd ed. New York: Humana Press (Springer Nature), 2016, p. 91-109.

CÉSAR, I. C. **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CÉSAR, I. C.; NOGUEIRA, F. H. A.; PIANETTI, G. A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 951-954, 2008.

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.

DU, Y.; TAGA, A.; SUZUKI, S.; LIU, W.; HONDA, S. Colominic acid: a novel chiral selector for capillary electrophoresis of basic drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 962, p. 221–231, 2002a.

DU, Y.-X.; HONDA, S.; TAGA, A.; LIU, W.Y.; SUZUKI, S. A Novel Polybrene/Chondroitin Sulfate C Double Coated Capillary and Its Application in Capillary Electrophoresis. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 20, p. 1557–1565, 2002b.

ELBASHIR, A. A.; SAAD, B.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I. Development of a Capillary Electrophoresis Method for the Enantioselective Estimation of Primaquine in Pharmaceutical Formulations. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 3, p. 536-541, 2008.

ELBASHIR, A. A.; SAAD, B.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Enantioselective analysis of primaquine and its impurity quinocide by capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 295-301, 2009b.

ELBASHIR, A. A.; SAAD, B.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of quinocide as impurity in primaquine tablets by capillary zone electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 464-471, 2009a.

ELBASHIR, A. A.; SULIMAN, F. E. O.; SAAD, B.; ALI, A. S. M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Capillary electrophoretic separation and computational modeling of inclusion complexes of β -cyclodextrin and 18-crown-6 ether with primaquine and quinocide. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 393-398, 2010.

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.

FIOCRUZ. **Doenças Negligenciadas**. Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>. Acesso em: 05 jan 2025.

FIOCRUZ. **Malária: região amazônica concentra 99% dos casos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/malaria-regiao-amazonica-concentra-99-dos-casos-no-brasil>. Acesso em: 05 jan 2025.

GLATZ, Z. Application of short-end injection procedure in CE. **Electrophoresis**, v. 34, p. 631-642, 2013.

HANCU, G., SIMON, B., RUSU, A., MIRCIA, E., GYÉRESI, A. Principle of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2013.

HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. Table of isotachophoretic indices: I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3 – 10. **Journal of Chromatography**, v. 271, p. D1 – D106, 1983.

HUFFORD, C. D.; MCCHESENEY, J. D.; BAKER, J.K. Assignments of dissociation constants of primaquine by ¹³C-NMR spectroscopy. **Journal of Hererochemical**, v. 20, p. 273–275, 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-08: Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**. Revisão 09. Rio de Janeiro: INMETRO, junho de 2020.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R2)**. 2022

KUEHNBAUM, N. L.; KORMENDI, A.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Multisegment Injection-Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry: A High-Throughput Platform for Metabolomics with High Data Fidelity. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 10664–10669, 2013.

LAMALLE, C.; MARINI, R. D. E. A.; DEBRUNS, B.; LEBRUN, P.; CROMMEN, J.; HUBERT, P.; SERVAIS, A. C.; FILLET, M. Development of a generic micellar electrokinetic chromatography method for the separation of 15 antimalarial drugs as a tool to detect medicine counterfeiting. **Electrophoresis**, v. 33, p. 1669-1678, 2012.

LY, R.; LY, N.; SASAKI, K.; SUZUKI, M.; KAMI, K.; OHASHI, Y.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Nontargeted Serum Lipid Profiling of Nonalcoholic Steatohepatitis by Multisegment Injection–Nonaqueous Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry: A Multiplexed Separation Platform for Resolving Ionic Lipids. **Journal of Proteome Research**, v. 21, p. 768–777, 2022.

MANOEL, R. V. G. **Desenvolvimento de métodos para determinação de cátions inorgânicos em leites, nitrito e nitrato em alface e histamina em peixes utilizando eletroforese capilar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MCGUFFIN, V. L.; TAVARES, M. F. M. Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 152-164, 1997.

MOREIRA, O. B. O., BERLANDE, B. M., SOUZA, J. C. Q., CANDIDO, J. M. B., JAEGER, L. H., ADRIANO, L. H. C., BRITO, M. A. D. A., NASCIMENTO, M. P., GERALDO, P. A., CHELLINI, P. R., OLIVEIRA, M. A. L. Capillary electromigration techniques applied to clinical chemistry investigations and alternative diagnostic assays: possibilities and perspectives. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 11, 2023.

NAIR, A.; ABRAHAMSSON, B.; BARENDS, D.M.; GROOT, D.W.; KOPP, S.; POLLI, J.E.; SHAH, V. P.; DRESSMAN, J. B. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Primaquine phosphate. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 101, p. 936–945, 2012.

NASCIMENTO, M. P.; MARQUES, R.; PEREIRA, M. P.; MARTINS, R. S.; BOMBONATO, F. I.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of purity and anionic exchange efficiency of amino acid ionic liquids synthesis by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 237, 122945, 2022.

NÉMETH, K.; TÁRKÁNYI, G.; VARGA, E.; IMRE, T.; MIZSEI, R.; IVÁNYI, R.; VISY, J.; SZEMÁN, J.; JICSINSZKY, L.; SZENTE, L.; SIMONYIA, M. Enantiomeric separation of antimalarial drugs by capillary electrophoresis using neutral and negatively charged cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 411-481, 2011.

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.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **World Neglected Tropical Diseases Day 2022**. Estados Unidos, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/campaigns/world-neglected-tropical-diseases-day-2022>. Acesso em: 06 mar 2023.

PENNA, E. A., SOUZA, J. C. Q.; OLIVEIRA, M. A. L.; CHELLINI, P. R. Determination of antimalarial drugs in pharmaceutical formulations and human blood by liquid chromatography: a review. **Analytical Methods**, v. 13, p. 4557-4584, 2021.

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

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys**, n. 8, p. 1-9, 2001.

RESENDE, L. A.; SILVA, P. H. R.; FERNANDES, C. Quantitative determination of the antimalarials artemether and lumefantrine in biological samples: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 304-314, 2019.

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.

RODRIGUES, K. T. **Separação de fármacos antimaláricos por eletroforese capilar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RYAN, R.; ALTRIA, K.; MCEVOY, E.; DONEGAN, S.; POWER, J. A review of developments in the methodology and application of microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 34, p. 159-177, 2013.

SAOI, M.; LI, A.; MCGLORY, C.; STOKES, T.; VON ALLMEN, M. T.; PHILLIPS, S. M.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Metabolic Perturbations from Step Reduction in Older Persons at Risk for Sarcopenia: Plasma Biomarkers of Abrupt Changes in Physical Activity. **Metabolites**, v. 9, 0134, 2019.

SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4339-4343, 1998.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 30, p. 129–135, 2009.

SIQUEIRA, S. A. **Desenvolvimento de novas estratégias analíticas para determinação de lumefantrina em comprimidos e em amostra biológica**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SOUZA, J. C. Q.; PENNA, E. A.; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Antimalarial analysis of pharmaceutical formulations and biological samples by capillary electrophoresis: the state of art and applications. **Analytical Methods**, v. 16, p. 5751-5776, 2024.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

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, Sean C. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 36th ed. London e Chicago: Pharmaceutical Press, 2009

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

VITRAL, J. M. P. M.; NASCIMENTO, M. P.; OLIVEIRA, M. A. L. Alternative method using Multiple-Injection Capillary Zone Electrophoresis with direct UV detection and single-point standard addition for determination of sorbate and benzoate in ready-to-drink tea. **Microchemical Journal**, v. 208, 112558, 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Tropical Diseases**. Genebra, 2023b. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 06 mar 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010-2019)**. Genebra, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The International Pharmacopoeia**. 12th ed. Genebra, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Guidelines for Malaria**. Genebra, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2014**. Genebra, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World NTD Day**. Genebra, 2023a. Disponível em: <https://worldntdday.org/learn-more/>. Acesso em: 06 mar 2023.

YANG, H.; DING, Y.; CAO, J.; LI, P. Twenty-one years of microemulsion electrokinetic chromatography (1991–2012): A powerful analytical tool. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1273-1294, 2013.

YIN, C.; CAO, Y.; DING, S.; WANG, Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 172-177, 2008.

YU, L.; CHU, K.; YE, H.; LIU, X.; YU, L.; XU, X.; CHEN, G. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 34, p. 140-151, 2012.

ZEMANN, A. J., SCHNELL, E., VOLGGER, D., BONN, G. K. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 563-567, 1998.

ZHANG, C.; ZHU, C.; LIN, X.; GAO, F.; WEI, Y. Enantiomeric separation of primaquina, an anti-malarial drug, by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary electrochromatography. **Analytical Sciences**, v. 18, p. 595-597, 2002.

ZHU, D.; LI, X.; SUN, J.; YOU, T. Chemometrics optimization of six antihistamines separations by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Talanta**, v. 88, p.265–271, 2012.

APÊNDICE I – Produção científica durante o doutorado

1) Artigos publicados:

GERALDO, P. A.; NASCIMENTO, M. P.; BERLANDE, B. M.; **SOUZA, J. C. Q.**; ADRIANO, L. H. C.; OLIVEIRA, M. A. L. Investigation of fatty acids in biological fluid samples and analysis by capillary electrophoresis: state of the art and applications. *Electrophoresis*, p. 1-15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.8134>

SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Primaquine Analysis in Pharmaceutical Formulation Using Multiple and Short-End Injections by Capillary Zone Electrophoresis-Ultraviolet Detection. *Journal of Separation Science*, v. 47, n. 22, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.70026>

SOUZA, J. C. Q.; PENNA, E. A.; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Antimalarial analysis of pharmaceutical formulations and biological samples by capillary electrophoresis: the state of the art and applications. *Analytical Methods*, v. 16, n. 34, p. 5751-5776, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1039/D4AY00860J>

GERALDO, P. A.; VELASCO, A. W. C.; BERLANDE, B. M.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; ADRIANO, L. H. C.; BRITO, M. A. D. A.; NASCIMENTO, M. P.; MOREIRA, O. B. O.; OLIVEIRA, M. A. L. Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: Fundamentals, advantages and applications. *Electrophoresis*, v. 45, p. 35-54, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.202300144>

MOREIRA, O. B. O.; BERLANDE, B. M.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; JAEGER, L. H.; ADRIANO, L. H. C.; BRITO, M. A. D. A.; NASCIMENTO, M. P.; GERALDO, P. A.; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Capillary electromigration techniques applied to clinical chemistry investigations and alternative diagnostic assays: possibilities and perspectives. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 34, n. 11, 2023. DOI: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230096>

MOREIRA, O. B. O.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; CHELLINI, P. R.; LEMOS, L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Factorial design applied to LC-ESI-

QTOF mass spectrometer parameters for untargeted metabolomics. *Analytical Methods*, v. 15, n. 20, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.1039/D3AY00094J>

MOREIRA, O. B. O.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; CHELLINI, P. R.; LEMOS, L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of creatinine in urine and blood serum human samples by CZE-UV using on-column internal standard injection. *Talanta*, v. 258, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124465>

PORTO, B. L. S.; FARIA, I. D. L.; **SOUZA, J. C. Q.**; MOREIRA, O. B. O.; GAMA, M. A. S.; OLIVEIRA, M. A. L. Rapid method for simultaneous determination of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid isomers in milk by GC-FID. *Química Nova*, v. 46, n. 7, p. 743-746, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20230026>

SILVA, I. R.; **SOUZA, J. C. Q.**; OLIVEIRA, M. A. L. Análise de Álcool a 70% e Impurezas: Métodos Analíticos, Controle de Qualidade, Riscos à Saúde e Legislação. *Revista Virtual de Química*, v. 15, n. 4, p. 807-815, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220135>

MOREIRA, O. B. O.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; PENNA, E. A.; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Capillary Electrophoresis Applied to Human Urine Analysis for Clinical Diagnosis: New Trends and Perspectives. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, v. 10, n. 39, p. 17-51, 2023. Esse artigo foi capa da edição.

DOI: <http://dx.doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-13-2022>

LIMA, N. M.; FERNANDES, B. L. M.; ALVES, G. F.; **SOUZA, J. C. Q.**; SIQUEIRA, M. M.; NASCIMENTO, M. P.; MOREIRA, O. B. O.; SUSSULINI, A.; OLIVEIRA, M. A. L. Mass spectrometry applied to diagnosis, prognosis, and therapeutic targets identification for the novel coronavirus SARS-CoV-2: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1195, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339385>

PENNA, E. A.; **SOUZA, J. C. Q.**; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of antimalarial drugs in pharmaceutical formulation and human blood by liquid chromatography: a review. *Analytical Methods*, v. 13, n. 39, p. 4557-4584, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1039/D1AY01173A>

SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; VIÇOSA, A. L.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Simultaneous separation of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by CZE-UV. *Analytical Methods*, v. 12, n. 47, p. 5709-5717, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1039/D0AY01755H>

2) Artigos submetidos ou em fase de finalização:

SOUZA, J. C. Q.; GERALDO, P. A.; CASTRO, L. A.; CHELLINI, P. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Multi-analytical techniques for chloroquine, primaquine, hydroxychloroquine and quinine analysis: a comparative study.

O artigo está em fase de escrita.

VELASCO, A. W. C.; **SOUZA, J. C. Q.**; OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of Chemical Markers Associated with Intrinsic Characteristics of Whisky.

O artigo está em fase de escrita.

3) Capítulo de livro publicado:

OLIVEIRA, M. A. L.; CAMPOS, G. P.; **SOUZA, J. C. Q.**; NASCIMENTO, M. P.; LIMA, N. M.; MOREIRA, O. B. O.; CHELLINI, P. R.; AMORIM, T. L. Recent Trends in the Analysis of Lipids, Carbohydrates, and Proteins in Food by Capillary Electrophoresis. *Current and Future Developments in Food Science Vol 2: Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. Bentham Books, 2022.

<https://benthamscience.com/chapter/17193>

APÊNDICE II – Participação em projetos

- 1) Carvalho, Marcos Fraga. Desenvolvimento de método para detecção de produtos de degradação da cloroquina por eletroforese capilar. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2024. Orientadora: Prof. Dra. Paula Rocha Chellini. Coorientadora: Me. Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza.

Atividades: Supervisão do discente no laboratório durante o preparo das soluções e amostras; responsável pelo uso do equipamento de eletroforese capilar para realizar as análises; orientação do discente no desenvolvimento do trabalho e na escrita do texto final.

- 2) Silva, Natália Prado. Diclofenaco de sódio e resveratrol co-encapsulados em carreador lipídico nanoestruturado visando o manejo do melanoma. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2024. Orientador: Frederico Pittella Silva. Coorientador: Guilherme Diniz Tavares.

Atividades: Auxílio no desenvolvimento, otimização e avaliação de algumas figuras de mérito de um método por eletroforese capilar de zona para separação simultânea de diclofenaco de sódio e resveratrol em uma formulação farmacêutica baseada em nanopartículas; supervisão do discente no laboratório durante o preparo das soluções e amostras; responsável pelo uso do equipamento de eletroforese capilar para realizar as análises; tratamento dos dados; supervisão do discente na escrita do texto relacionado a eletroforese capilar.

- 3) Projeto “Técnicas de eletromigração e cromatográficas aplicadas ao estudo de metabóloma da urina para o diagnóstico da COVID-19”.

O projeto foi coordenado pelo Prof. Dr. Marcene Augusto Leal de Oliveira em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas Lemos.

Atividades: Preparo do laboratório para trabalhar com amostras biológicas; recebimento das amostras de urina no laboratório; manuseio para organizar e armazenar as amostras de urina em ultrafreezer.

- 4) Projeto “Programa de monitoramento de gordura trans em alimentos” em parceria com a ANVISA.

O projeto foi coordenado pelo Prof. Dr. Marcene Augusto Leal de Oliveira em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e teve como integrantes as discentes

Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza, Maria Patrícia do Nascimento, Patrícia Abranches Geraldo e Olívia Brito de Oliveira Moreira.

Atividades: Coleta das amostras de óleos e alimentos variados; preparo das soluções e das amostras; operação do equipamento de eletroforese capilar para as análises; tratamentos dos dados obtidos; elaboração de relatório.

APÊNDICE III – Participação em eventos

SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Primaquine Analysis in Pharmaceutical Formulation Using Multiple and Short-End Injections by Capillary Zone Electrophoresis-Ultraviolet Detection. *29th Latin American Symposium on Capillary Electrophoresis, Microfabrication and Related Techniques (LACE) & Brazilian Symposium on Metabolomics (BrMET)*, Guarujá, São Paulo, Brazil, 2024.

SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; VIÇOSA, A. L.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Simultaneous separation of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by CZE-UV. *29th Latin American Symposium on Capillary Electrophoresis, Microfabrication and Related Techniques (LACE) & Brazilian Symposium on Metabolomics (BrMET)*, Guarujá, São Paulo, Brazil, 2024.

GERALDO, P. A.; VELASCO, A. W. C.; BERLANDE, B. M.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; ADRIANO, L. H. C.; BRITO, M. A. D. A.; NASCIMENTO, M. P.; MOREIRA, O. B. O.; OLIVEIRA, M. A. L. Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: Fundamentals, advantages and applications. *21^o Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)*, Belém, Pará, Brasil, 2024.

OLIVEIRA, M. A. L.; **SOUZA, J. C. Q.**; CANDIDO, J. M. B.; NASCIMENTO, M. P.; MOREIRA, OLÍVIA B.O.; CHELLINI, P. R. Capillary Electrophoresis with UV detection applied to analysis of urinary organic acids for targeted metabolomics. *20^o Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)*, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil, 2022.

CHELLINI, P. R.; **SOUZA, J. C. Q.**; MOREIRA, O. B. O.; OLIVEIRA, M. A. L. Potencialidades da Eletroforese Capilar de Zona em Análises de Fármacos. *15^o Congresso de Farmácia e Bioquímica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2021.

APÊNDICE IV – Coorientação de projetos

SILVA, ISABELLA RODRIGUES; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL DE (ORIENTADOR); DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ (COORIENTADORA).

Revisão do uso do método analítico de cromatografia gasosa na análise da concentração e presença de impurezas em soluções alcóolicas a 70%. 2021. Projetos em Química I e II (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2021.

GERALDO, PATRÍCIA ABRANCHES; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL DE (ORIENTADOR); DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ (COORIENTADORA).

Avaliação de técnicas cromatográficas e de eletromigração para análise de cloroquina e derivados: um estudo comparativo. 2020. Projetos em Química I e II (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2020.

VELASCO, ARTHUR WOYAMES DE CASTRO; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL DE (ORIENTADOR); DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ (COORIENTADORA). **Identificação e avaliação de alguns marcadores químicos associados as características intrínsecas da qualidade do whisky – uma revisão.** 2021. Projetos em Química I e II (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2021.

PENNA, EDUARDA ALVES; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA); DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ (COORIENTADORA). **Análise crítica de métodos analíticos por cromatografia líquida para determinação de fármacos antimaláricos.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.

CARVALHAL, MARCOS FRAGA; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA); DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ (COORIENTADORA). **Desenvolvimento de método para detecção de produtos de degradação da cloroquina por eletroforese capilar.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

APÊNDICE V – Participação em bancas

GUIDA, EDUARDA NASSUR; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA). **Determinação dos parâmetros do sistema cromatográfico aplicando Analytical Quality by Design no desenvolvimento de métodos de doseamento por HPLC.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

CAROBINI, LUANA ROCHA; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA). **Desenvolvimento e avaliação de sabonete em barra à base de cúrcuma (*curcuma longa l.*).** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.

CALIL, MARCELA SILVA ALHADAS; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA). **Avaliação de descolorantes capilares e resistência dos fios de cabelo à processos químicos.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

TRIDADE, NICOLE OLIVEIRA; CHELLINI, PAULA ROCHA (ORIENTADORA). **O uso da análise sensorial em cosmetologia: uma revisão de literatura.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.