

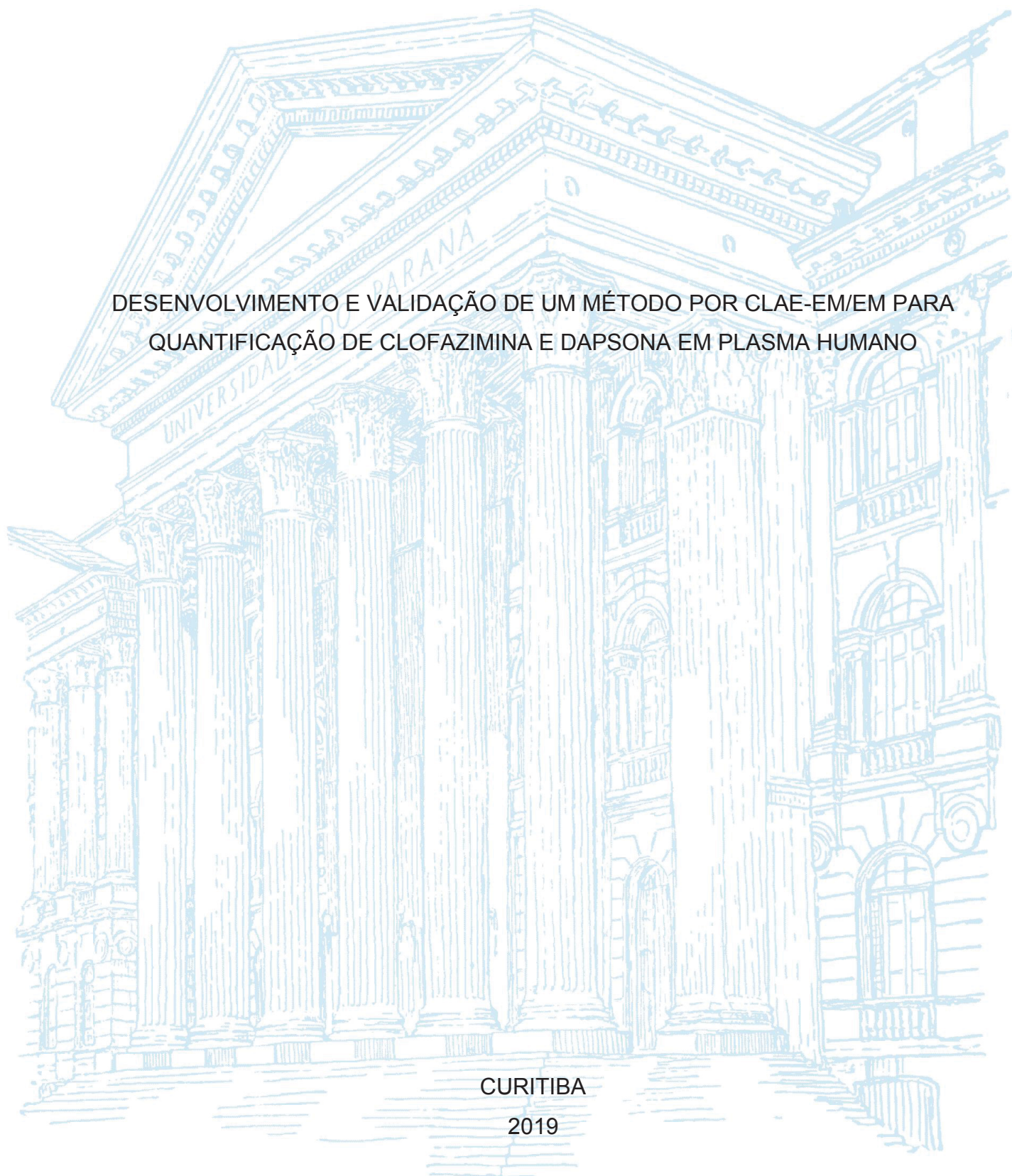
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VICTOR CONCENTINO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM PLASMA HUMANO

CURITIBA

2019



VICTOR CONCENTINO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM PLASMA HUMANO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Prof. Dr. Michel Leandro Campos

CURITIBA

2019

Concentino, Victor

Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para quantificação de Clofazimina e Dapsona em plasma humano [recurso eletrônico] / Victor Concentino – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. Michel Leandro Campos

1. Hanseníase. 2. Clofazimina. 3. Dapsona. 4. CLAE-EM/EM. 5. Monitorização terapêutica. I. Pontarolo, Roberto. II. Campos, Michel Leandro. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.19



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de VICTOR CONCENTINO intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE-EMEM PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM PLASMA HUMANO**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTARÓLO, que após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Julho de 2019.

ROBERTO PONTARÓLO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FLAVIA LADA DEGAUT PONTES

Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE JOINVILLE)

Dedico, com amor, aos meus pais e a minhas avós
que tornaram todos os meus sonhos realidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo pelos inúmeros ensinamentos, conselhos e lições de vida durante estes últimos anos, além de ter me concedido as melhores oportunidades acadêmicas e profissionais do que eu pude desejar, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Michel Leandro Campos por ter coorientado este trabalho e socorrido nos momentos de dúvidas e dificuldades. Sua dedicação e comprometimento como pesquisador e professor são de grande inspiração para mim.

Aos meus pais Mirian e Ricardo que com muito trabalho, amor e dedicação forneceram todo o suporte para que eu chegasse onde estou. Não há palavras para descrever o quão grato eu sou a vocês. Muito obrigado!

Às minhas avós Carmen e Edyr que me criaram com muito amor e carinho e sempre acreditaram nos meus sonhos e nas minhas capacidades. Espero poder lhes recompensar ao máximo por todo o esforço e dedicação durante estes anos, não importando dor ou cansaço, vocês sempre deram para mim muito mais do que poderiam. Mesmo vocês não estando mais aqui para presenciar este momento tão importante da minha vida e com o qual a sempre sonharam, saibam que estarão sempre em meu coração.

À minha inseparável companheira Vanessa, muito obrigado pelos melhores anos da minha vida, pelo companheirismo, carinho, dedicação, e incontáveis momentos de felicidade. Você me torna uma pessoa melhor, sempre ao meu lado e me empurrando para alcançar meus objetivos. Você sempre será única para mim. Muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos Allan, Alcindo, Fernanda, Melissa, Mariana A. e Rebeca, vocês tornaram o dia-a-dia mais fácil, agradável e divertido. Agradeço do fundo do coração por sua amizade.

Aos meus colegas de laboratório, Alexandre, Allan, Beatriz, Breno, Danilo, Eric, Flávia, Josi, Luan, Mariana, Raphaella, Raquel, Rebeca e Reginaldo, muito obrigado pela ajuda, ensinamentos e companhia durante estes anos, pela grande ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, devo muito a vocês.

Muito Obrigado a Todos!

***“Long you live and high you’ll fly, and smiles
you’ll give, tears you’ll cry and all you touch and
all you see is all your life will ever be”***

Pink Floyd – Breath

RESUMO

Hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae* e *M. lepratomatosis*) que acomete a pele e o sistema nervoso periférico e possui como principal característica a presença de lesões hipopigmentadas ou avermelhadas, com eventual perda da sensibilidade local. Com o intuito de aprimorar o tratamento e evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, em 1981 a OMS instituiu a utilização da poliquimioterapia (PQT), associando dapsona a clofazimina e a rifampicina, sua utilização mostrou-se altamente efetiva no tratamento da hanseníase, levando rapidamente o paciente a um quadro não infeccioso contribuindo para a redução considerável do número de casos de hanseníase. Porém a taxa de detecção de novos casos tem se mantido constante nos últimos anos, sendo necessário a realização de ações no aprimoramento do tratamento da hanseníase como a monitorização terapêutica, que permite possíveis ajustes de doses e pode contribuir para explicar possíveis falhas no tratamento. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método por CLAE-EM/EM para quantificação de clofazimina e dapsona em plasma humano visando a sua aplicação na monitorização terapêutica. As amostras foram preparadas utilizando-se o protocolo de extração por precipitação de proteínas com acetonitrila. Utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilente 1200 acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo API 3200 Applied Biosystems, provido de fonte de ionização Electrospray (ESI), operado no modo positivo de ionização. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna XTerra MS C18 150 x 2,1 mm, 3,5 µm, utilizando como fase móvel uma mistura de água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1; v/v/v), em modo isocrático com fluxo de 400 µL/min. O método desenvolvido e validado mostrou-se seletivo, livre de efeito residual e efeito matriz. Os limites de quantificação (50 ng/mL para a clofazimina e 100 ng/mL para a dapsona) demonstram que a sensibilidade do método é adequada para a utilização proposta. As curvas de calibração apresentaram uma excelente correlação ($r \geq 0,99$) nas faixas de 0,05 a 5,00 µg/mL para a clofazimina e 0,10 a 10,00 µg/mL para a dapsona. Nos diferentes níveis de concentração as variações de precisão e exatidão foram menores que 15%. A recuperação dos analitos (> 80%) foi obtida com elevada reprodutibilidade (DPR% < 10%). Sob as condições normais de trabalho foi observado excelente estabilidade dos analitos tanto em plasma quanto em solução. Deste modo, os resultados obtidos pela validação indicam que o método desenvolvido está apto para ser utilizado.

Palavras-chave: Hanseníase; Clofazimina; Dapsona; CLAE-EM/EM; Monitorização Terapêutica.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae* (*M. leprae* and *M. lepratomatosis*) complex that affects the skin and peripheral nervous system and has as main characteristic the presence of hypopigmented or reddish lesions with possible loss of local sensitivity. In order to improve treatment and avoid the development of bacterial resistance to dapsons, in 1981 the WHO instituted the use of the multidrug therapy (MDT), associating dapsons with clofazimine and rifampicin. The use of MDT was highly effective in the treatment of leprosy, being able to quickly take the patient to a non-infectious setting, leading to a considerable reduction in the number of cases of leprosy. However, the rate of detection of new cases has remained constant in recent years. Thus, it is necessary to perform actions to improve the treatment of leprosy. One of the tools that can be used for this purpose is therapeutic monitoring, which allows possible dose adjustments and explains possible treatment failures. Therefore, the objective of the present work was to develop and validate a method according to the main bioanalytical guidelines, using HPLC-MS/MS for the quantification of clofazimine and dapsons in human plasma, aiming at its application in therapeutic monitoring. The samples were processed using protein precipitation with acetonitrile extraction protocol. An Agilent 1200 high performance liquid chromatography system coupled with a API 3200 Applied Biosystems mass spectrometer, provided with Electrospray ionization source (ESI), operated in positive ionization mode. Chromatographic separation was achieved on a X-Terra MS C18 column (150 x 2.1 mm, 3.5 μ m), using as mobile phase a mixture of water:acetonitrile:formic acid (40:60:0.1; v/v/v), in isocratic mode with flow of 400 μ L/min. The analytes were analyzed in the positive ionization mode using electrospray as the ionization source. The validation results showed the developed method is selective, free of residual and matrix effect. Quantification limits (50 ng/mL for clofazimine and 100 ng/mL for dapsons) demonstrate the sensitivity of the method is adequate for the proposed use. The calibration curves showed an excellent correlation ($r \geq 0.99$) in the ranges of 0.05 to 5.00 μ g/mL for clofazimine and 0.10 to 10.00 μ g/mL for dapsons. At different levels of concentrations, the variations of precision and accuracy were less than 15%. The recovery of the analytes (> 80%) showed high reproducibility (RSD% < 10%). Under normal working conditions, excellent stability of the analytes was observed in both plasma and solution. In this way, the results obtained by the validation show that the developed method is apt to be used.

Keywords: Leprosy; Clofazimine; Dapsons; HPLC-MS/MS; Therapeutic Monitoring.

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – CALCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO	46
EQUAÇÃO 2 – CALCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO	46
EQUAÇÃO 3 – CALCULO DA RECUPERAÇÃO OBTIDA EXPERIMENTALMENTE	47
EQUAÇÃO 4 – CALCULO DO FATOR MATRIZ NORMALIZADO.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MIGRAÇÃO DA HANSENÍASE AO LONGO DA HISTÓRIA HUMANA	20
FIGURA 2 – PERCENTUAL DOS CASOS DE HANSENÍASE EXAMINADOS E CURADOS NO BRAIL NO PERÍODO DE 2008 A 2016	26
FIGURA 3 – FORMULA ESTRUTURAL DA DAPSONA	33
FIGURA 4 – FORMULA ESTRUTURAL DA CLOFAZIMINA.....	34
FIGURA 5 – GRUPOS FUNCIONAIS ACEITADORES DE H ⁺	51
FIGURA 6 – ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLOFAZIMINA NO MODO POSITIVO	51
FIGURA 7 – ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DAPSONA NO MODO POSITIVO	52
FIGURA 8 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLOFAZIMINA NO MODO POSITIVO.....	53
FIGURA 9 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DAPSONA NO MODO POSITIVO.....	53
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA COMPARATIVO X-TERRA C18 E ZORBAX C8	56
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA COMPARATIVO COLUNA X-TERRA C18 E X-BRIDGE C18.....	57
FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS NA FASE MÓVEL ..	59
FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS DA FASE MÓVEL NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA CLOFAZIMINA	60
FIGURA 14 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS DA FASE MÓVEL NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA DAPSONA.....	60
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA FINAL OBTIDO COM O MÉTODO DESENVOLVIDO	61
FIGURA 16 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA	66
FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DAPSONA.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – TEMPO DE RETENÇÃO DA CLOFAZIMINA E DAPSONA EM RELAÇÃO A PROPORÇÃO DE ACETONITRILA NA FASE MOVEL 58	
GRÁFICO 2 – RECUPERAÇÃO CLOFAZIMINA OBTIDA EM PLASMA UTILIZANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	62
GRÁFICO 3 – RECUPERAÇÃO DAPSONA OBTIDA EM PLASMA UTILIZANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS OTIMIZADOS	38
QUADRO 2 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS.....	39
QUADRO 3 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALITICAS DE CLOFAZIMINA E DAPSONA	44
QUADRO 4 – CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NOS CONTROLES DE QUALIDADE	45
QUADRO 5 – PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS PADRÃO DO EQUIPAMENTO.....	50
QUADRO 6 – PARAMETROS ESPECTROMETRICOS PADRÃO DO EQUIPAMENTO.....	52
QUADRO 7 – ÍONS MOLECULARES E FRAGMENTOS ENCONTRADOS	54
QUADRO 8 – PARAMETROS ESPECTROMÉTRICOS OTIMIZADOS	54
QUADRO 9 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS.....	55
QUADRO 10 – MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	56
QUADRO 11 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA ...	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – OCORRENCIAS DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE ENTRE 2008 E 2017 NOS PAISES COM MAIOR INCIDENCIA DE HANSENÍASE	25
TABELA 2 – ÁREAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA CLOFAZIMINA, DAPSONA E MEBENDAZOL EM PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO	64
TABELA 3 – RESUMO DAS AREAS OBTIDAS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA	65
TABELA 4 – RESUMO DAS AREAS OBTIDAS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DAPSONA.....	65
TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS PELA ANOVA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA	67
TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS PELA ANOVA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA	67
TABELA 7 – INFORMAÇÕES DA REGRESSÃO LINEAR DA CLOFAZIMINA.....	67
TABELA 8 – INFORMAÇÕES DA REGRESSÃO LINEAR DA DAPSONA	68
TABELA 9 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PELO MÉTODO BIOANALITICO DESENVOLVIDO PARA A CLOFAZIMINA.....	68
TABELA 10 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PELO MÉTODO BIOANALITICO DESENVOLVIDO PARA A DAPSONA	69
TABELA 11 – VALORES DE RECUPERAÇÃO DA CLOFAZIMINA E DAPSONA ATRAVÉS DA TECNICA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA.....	69
TABELA 12 – RESULTADOS EFEITO MATRIZ	70
TABELA 13 – RESULTADOS EFEITO RESIDUAL.....	70
TABELA 14 – RESULTADOS ESTABILIDADE EM PLASMA.....	71
TABELA 15 – RESULTADOS ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AE	- Amostras Fortificadas antes da Extração
AF	- Amostras fortificadas após a Extração
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	- Borderline
BB	- Borderline-Borderline
BL	- Borderline-Lepromatosa
BT	- Borderline-Tuberculóide
CLAE-EM/EM	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas Sequencial
CQ	- Controle de Qualidade
CQA	- Controle de Qualidade Alto
CQB	- Controle de Qualidade Baixo
CQD	- Controle de Qualidade de Diluição
CQ-LIQ	- Controle de Qualidade do Limite Inferior de Quantificação
CQM	- Controle de Qualidade Médio
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNSP	- Departamento Nacional de Saúde Pública
DPR%	- Desvio Padrão Relativo
ELISA	- Ensaio de Imunoabsorção a detecção de anticorpos específicos
EPR%	- Erro Padrão Relativo
ESI	- Fonte de Ionização por <i>electrospray</i>
FMN	- Fator de Matriz Normalizado
GIF2	- Grau de Incapacidade Física 2
IB	- Índice Baciloscópico
ICH	- Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Fármacos de uso Humano
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPLDV	- Inspeção de Profilaxia da Lepra e Doenças Venéreas
L	- Lepromatosa ou Virchowiana
LD	- Limite de Detecção
LIQ	- Limite Inferior de Quantificação
LL	- Lepromatosa-Lepromatosa
MORHAN	- Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase
MTBE	- Éter Metil-Terc-Butílico
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PABA	- Ácido Para-Aminobenzóico
PCR	- Reação da Polimerase em Cadeia
PI	- Padrão Interno
PNEH	- Plano Estratégico para Eliminação da Hanseníase
PQT	- Poliquimioterapia
r	- Coeficiente de Correlação

r ²	- Coeficiente de Determinação
T	- Tuberculóide
TCA	- Ácido Tricloroacético
TFA	- Ácido Trifluoroacético
TT	- Tuberculóide-Tuberculóide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 HISTORICO	19
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	23
2.3 EPIDEMIOLOGIA	23
2.4 TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE	27
2.5 DIAGNOSTICO	28
2.6 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENIASE	30
2.7 TRATAMENTO.....	31
2.7.1 Dapsona	32
2.7.2 Clofazimina.....	34
2.8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 SUBSTÂNCIAS QUIMICAS	37
3.2 SOLVENTES E REAGENTES	37
3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO	37
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE	37
3.5 INSTRUMENTAÇÃO	38
3.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALITICO	39
3.6.1 Otimização dos parâmetros espectrométricos	39
3.6.2 Otimização dos parâmetros cromatográficos	40
3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	40
3.8 PREPARO SOLVENTE EXTRATOR	42
3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS	42
3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	42
3.10.1 Limite de detecção e quantificação	43
3.10.2 Seletividade.....	43
3.10.3 Curva de calibração.....	43

3.10.4 Amostra de controle de qualidade	44
3.10.5 Precisão e Exatidão.....	45
3.10.6 Recuperação	46
3.10.7 Efeito Matriz	47
3.10.8 Efeito Residual	47
3.10.9 Estabilidade.....	48
3.10.9.1 Estabilidade dos analitos em plasma.....	48
3.10.9.2 Estabilidade dos analitos em solução.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALITICO	50
4.1.1 Otimização dos parâmetros espectrométricos	50
4.1.2 Otimização dos parâmetros cromatográficos	55
4.2 AVALIAÇÃO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	61
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	63
4.3.1 Limite de detecção e quantificação	63
4.3.2 Seletividade.....	64
4.3.3 Curva de calibração.....	64
4.3.4 Precisão e Exatidão	68
4.3.5 Recuperação	69
4.3.6 Efeito Matriz	70
4.3.7 Efeito Residual	70
4.3.8 Estabilidade.....	71
4.3.8.1 Estabilidade dos analitos em plasma.....	71
4.3.8.2 Estabilidade dos analitos em solução.....	71
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae* e *M. lepratomatosis*) que acomete a pele e o sistema nervoso periférico. Possui, como principal característica, a presença de lesões hipopigmentadas ou avermelhadas, com eventual perda da sensibilidade local (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente que apresenta característico tropismo pelas células do sistema reticuloendotelial e do sistema nervoso periférico, sobretudo pelas células de Schwann. Deste modo, a hanseníase é caracterizada pela infecção crônica da pele e nervos periféricos, sendo que o comprometimento neuronal pode levar a incapacidade física irreversível. Também é capaz de causar lesões cutâneas desfigurantes, danos ao sistema nervoso periférico, deformidades osteoarticulares, perda ou disfunção de membros e cegueira, além de estigma social usualmente relacionado a hanseníase (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; FRANCO-PAREDES; RODRIGUEZ-MORALES, 2016).

Durante a maior parte da história da humanidade não existiu um tratamento efetivo para a hanseníase, sendo a redução da transmissão a única ferramenta disponível para a redução dos casos da doença. Os indivíduos contaminados viviam segregados da sociedade, e na Idade Média, devido à urbanização e consequente aumento dos casos da doença, surgiram os primeiros leprosários, a fim de isolar os portadores da doença (MARIOTTI *et al.*, 2005; MACIEL, 2018).

O isolamento dos doentes foi o único meio de lidar efetivamente com a doença até a introdução do primeiro tratamento medicamentoso com a dapsona em 1941. Devido à falta de profilaxia, através da utilização da dapsona o tratamento e, eventual cura da hanseníase, tornou-se possível, eliminando as fontes de infecção e possibilitando que os portadores da doença fossem reintroduzidos na sociedade (BRASIL, 2002; BELDARRAÍN-CHAPLE, 2017).

A dapsona permaneceu como o único tratamento disponível durante três décadas e devido sua prolongada utilização, normalmente de maneira inadequada e com interrupção precoce do tratamento, surgiram casos de resistência bacteriana (CRUZ *et al.*, 2017; NAAZ *et al.*, 2017). A fim de reduzir o número crescente de casos de resistência bacteriana, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1981, instituiu a utilização da poliquimioterapia (PQT), recomendando-se a utilização de dapsona

associada a doses mensais de rifampicina para a forma tuberculóide (paucibacilar) e da adição da clofazimina a esta associação em casos da forma lepromatosa (multibacilar) da doença (BRASIL, 2002).

A utilização da PQT mostrou-se altamente efetiva, sendo capaz de rapidamente levar o paciente a um quadro não infeccioso e evitando o desenvolvimento de resistência bacteriana aos medicamentos. Apesar da aplicação intensiva da PQT ter levado a uma redução considerável do número de casos de hanseníase, a taxa de detecção de novos casos tem se mantido constante, mostrando que as estratégias de controle, o que inclui o diagnóstico e tratamento, não estão atingindo a eficácia desejada (BRASIL, 2002; GOULART e GOULART, 2008).

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença é reduzido, portanto é de extrema importância que os medicamentos disponíveis sejam utilizados da melhor forma possível a fim de evitar falhas terapêuticas. Uma das possíveis causas de falha terapêutica é quando os níveis plasmáticos se encontram abaixo do esperado nas concentrações normalmente utilizadas. A adequação dos níveis plasmáticos pode ser conseguida por meio da monitorização terapêutica. (BABALIK *et al.*, 2011; SEKAGGYA-WILTSHIRE *et al.*, 2018).

O estabelecimento adequado da monitorização terapêutica se inicia através do aprofundamento do conhecimento da cinética destes fármacos, a fim de se determinar um modelo farmacocinético. Para isto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar estes compostos com precisão e exatidão no plasma dos pacientes (STURKENBOOM *et al.*, 2015).

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar da PQT proposta pela OMS ser o padrão ouro no tratamento da hanseníase, há múltiplos relatos de resistência bacteriana aos fármacos utilizados, principalmente quando estes são utilizados fora da associação ou de maneira incorreta, levando a recidiva da doença e transmissão (KAR; GUPTA, 2015).

Por esta razão, a aplicação da monitorização terapêutica pode produzir evidências da necessidade de possíveis ajustes na dose de pacientes que fazem uso desta farmacoterapia, além de explicar possíveis causas de insucesso do tratamento.

Este fato justifica desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de detectar e quantificar os fármacos utilizados no tratamento da hanseníase de maneira precisa e exata.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método por CLAE- EM/EM, para a quantificação de clofazimina e dapsona em plasma humano visando estudos farmacocinéticos e ajuste de dose.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros espectrométricos e cromatográficos para os analitos de interesse, adequando-os para um método único que contemple a quantificação de ambos os analitos simultaneamente;
- Estabelecer as condições de extração e purificação dos analitos em amostras de plasma, utilizando as técnicas de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido;
- Validar o método desenvolvido de acordo com a norma nacional vigente (RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA) e internacional (ICH Topic Q2 (R1)).

2 REVISÃO DE LITERATURA

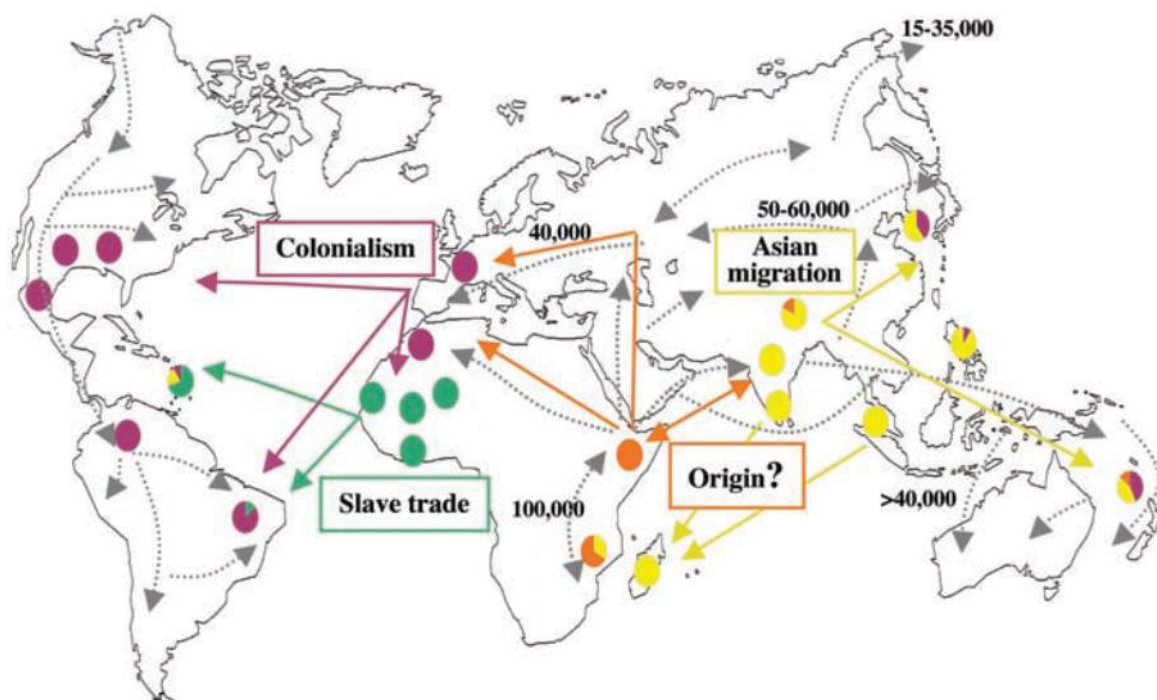
2.1 HISTORICO

A lepra, doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* que hoje conhecemos como hanseníase, está entre as doenças de pele descritas em textos do velho mundo, cujas evidências foram encontradas em esqueletos datados há 4000 anos na Índia. O termo lepra é de origem grega – lepein – e significa descamar, esfoliar e no período helênico tinha conotação de “impureza” ou “desonra”. Já o termo hanseníase é um tributo ao cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen, que identificou o bacilo *M. leprae* como o agente causador da doença em 1873. Este termo foi proposto em 1967 pelo Prof. Abraão Rotberg, a fim de reduzir o estigma relacionado a doença, e foi oficialmente adotado pelo Brasil em 1970, se tornando mandatário pela Lei Federal nº 9010 em 29 de março de 1995 (ARAUJO OPROMOLLA; CARLOS; MARTELLI, 2005; LASTÓRIA; ABREU, 2014; RIBEIRO; SILVA; OLIVEIRA, 2018).

A hipótese mais aceita sobre a origem da doença é que ela tenha surgido na Índia, sendo depois levada para a Europa durante o retorno das tropas das campanhas de Alexandre, o Grande, na Região Asiática (MONOT *et al.*, 2005; ROBBINS *et al.*, 2009; SOUSA; SILVA; XAVIER, 2017). Acredita-se que a propagação da hanseníase na Europa esteja relacionada com a expansão do Império Romano, tendo em vista que o achado arqueológico mais antigo com sinais de infecção pelo *M. leprae* na região é um esqueleto de um romano, datado de 400 anos a.C. Relatos da doença também foram encontrados em diversas civilizações, como egípcia, chinesa, grega e celta (HULSE, 1972; MARIOTTI *et al.*, 2005).

Através do sequenciamento genético do *M. leprae* e de descobertas de materiais genéticos provenientes de esqueletos humanos de séculos passados, foi possível obter informações sobre a migração da doença ao longo da história humana, como exemplificado na Figura 1. Como exemplo, o estudo realizado por Schuenemann e colaboradores (2013), mostram a semelhança do genótipo do *M. leprae* encontrado em esqueletos de diversas regiões da Europa, como o Reino Unido, Suíça e Dinamarca. Além da alta semelhança com o genótipo atual, observou-se também a alta conservação genética do microrganismo durante os últimos 1000 anos (MONOT *et al.*, 2005).

FIGURA 1 – MIGRAÇÃO DA HANSENÍASE AO LONGO DA HISTÓRIA HUMANA



Nota: Os círculos indicam a origem as amostras examinadas e sua distribuição pelo mundo com base em suas características genéticas, divididos em 4 grupos indicados pelas cores. As setas coloridas indicam a migração humana predita pela análise genéticas das amostras de *M. leprae* e as setas cinzas a migração derivada de estudos arqueológicos ou antropológicos. O tempo de migração é estimado em anos.

Fonte: (MONOT *et al.*, 2005)

Na Idade Média, o aumento da população em cidades, somado às condições pobres de higiene, nutrição e saúde contribuíram para a propagação de doenças infecciosas, incluindo a hanseníase. A endemia de hanseníase já era reconhecida como um problema social, visto que, os primeiros leprosários, instituições especializadas no isolamento de pessoas infectadas pelo *M. leprae*, surgiram nesta época (MARIOTTI *et al.*, 2005). Semelhante ao que aconteceu na antiguidade hebraica, o isolamento dos portadores de hanseníase na Europa Medieval era responsabilidade dos representantes da Igreja Católica. Nesta época era comum que os portadores da doença utilizassem vestimentas específicas para diferenciá-los da população saudável, além de carregar consigo algum instrumento como sinos ou matracas, a fim de alertar caso pessoas se aproximassem (MACIEL, 2018).

A partir do século XV houve um grande declínio na incidência da hanseníase na Europa. Apesar da falta de consenso entre os historiadores, os avanços no isolamento dos doentes e nas condições sociais em geral, além da ascensão de outras

doenças infecciosas letais, como a tuberculose e a peste bubônica, são possíveis causas deste rápido declínio (SCHUENEMANN *et al.*, 2013; MACIEL, 2018).

A hanseníase veio ao Brasil com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente os açorianos, entrando por diversos pontos ao longo do litoral. Os primeiros casos da doença no Brasil foram notificados no Rio de Janeiro, em 1600. Apesar de estar presente desde o início da colonização, o *M. leprae* foi disseminado pelo Brasil e outros países da América Latina durante o século XVIII, devido ao tráfico de escravos e a colonização europeia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1960; MONOT *et al.*, 2005; FARIA; CALÁBRIA, 2017).

Inicialmente os doentes eram expulsos das cidades e vilarejos, sendo obrigados a vagar pelos arredores dos centros urbanos, porém no início do século XX, devido ao aumento da população doente, a hanseníase passou a ser um problema de ordem social, e, conseqüentemente, passou a ser controlada pelo estado (SCHNEIDER; WADI, 2009). A hanseníase foi então tratada com severas políticas públicas de isolamento compulsório, período em que foram criados os primeiros hospitais destinados ao isolamento dos portadores de hanseníase. Estes hospitais foram construídos com mercados, casas, opções de lazer, entre outros, com o intuito de que os doentes, depois de internados, não precisassem deixar o local (SCHNEIDER; WADI, 2009; FARIA; CALÁBRIA, 2017).

A hanseníase ganhou importância no cenário das políticas de saúde brasileira em 1902, com a normativa relativa ao Serviço de Higiene e Defesa da Capital da República, regulamentando o Decreto nº 4.464 de 12/07/1902. Em 1903, Oswaldo Cruz, então diretor da Diretoria Geral de Saúde Pública, inspirou o Código Sanitário, que, por meio do Decreto nº 5.156 de 08/03/1904, tornou obrigatória a notificação da doença no país. Entretanto, estes instrumentos normativos possuíam pouca eficácia nas regiões fora do Rio de Janeiro. A hanseníase não era prioridade da saúde pública no Brasil até a criação da Inspetoria de Profilaxia da Lepra e Doenças Venéreas (IPLDV) em 1920, pelo Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), sendo a primeira política pública de combate à hanseníase a partir da Reforma Carlos Chagas. Através da criação da IPLDV, a hanseníase tornou-se uma questão nacional, com uma centralização técnica e administrativa rigorosa diante dos estados (GENOVEZ; PEREIRA, 2014).

Do início do século XX até 1960 foram criados no Brasil 57 leprosários, 36 preventórios e 40 dispensários, constituindo-se a base do tripé do tratamento da

doença que envolvia isolamento dos doentes nos leprosários, fiscalização das famílias e outras pessoas que entravam em contato com os doentes, por meio de exames periódicos – através dos dispensários – e a separação dos filhos sadios em instituições chamadas de preventórios, provendo educação e os inserindo na sociedade. Estas medidas não resultavam no tratamento da doença, somente na prevenção da transmissão para a população sadia. (CUNHA, 2005; FARIA; CALÁBRIA, 2017)

Somente na década de 1950 que o primeiro tratamento eficaz para a hanseníase surgiu, com a utilização de sulfonamidas, mais especificamente a dapsona. Com a descoberta da rifampicina em 1957, e sua consequente utilização em associação com a dapsona, ocorreram as primeiras altas de pacientes com hanseníase. (SCHNEIDER; WADI, 2009; CETOLIN *et al.*, 2010)

O surgimento de um tratamento eficaz para a hanseníase levou a diversas discussões internacionais e nacionais sobre a manutenção ou não das políticas isolacionistas da hanseníase. Em 7 de maio de 1962 foi aprovado o Decreto nº 968, estabelecendo normas técnicas especiais para o combate à hanseníase, incluindo estudos e pesquisas, preparo técnico de pessoal, educação sanitária, inquéritos epidemiológicos, busca de novos doentes, tratamento, assistência social, vigilância sanitária e limitação da movimentação das fontes de contágio, supondo discretas nuances de um relaxamento do isolamento compulsório em instituições leprosas para determinados pacientes (GENOVEZ; PEREIRA, 2014).

A internação dos doentes em leprosários passou a ser facultativa a partir de 1972, permitindo o paciente ser acompanhado em ambulatório. Com isto, poderia ser reintegrado à sociedade e retornar as atividades, como trabalho e estudo (CLARO, 1995).

O Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase (MORHAN) foi fundado em 6 de junho de 1981 com ex-pacientes internos dos asilos-colônias, com a finalidade de promover ações educativas visando a prevenção, diagnóstico precoce, tratamento, reabilitação e participação social de portadores. Atualmente, existem núcleos em quase todos os estados do Brasil, com mais de um núcleo por região (SANTOS *et al.*, 2015).

O Plano Estratégico para Eliminação da Hanseníase (PNEH) criado em 2006, tem por base o princípio da sustentabilidade proposto pela OMS, apresentando como componente da estratégia, a decisão política para alcançar baixos níveis endêmicos

dessa doença, assegurando que as atividades de controle da hanseníase estejam disponíveis e acessíveis a todos os indivíduos nos serviços de saúde mais próximos de suas residências. O PNEH desenvolve suas ações em parceria com organizações não-governamentais e com entidades governamentais e civis, assegurando a redução da ocorrência de novos casos. Este plano tem atenção especial aos estados que ainda têm uma alta carga da doença: Pernambuco, Goiás, Espírito Santo, Pará, Tocantins, Maranhão, Mato Grosso, Rondônia e Roraima. (BRASIL, 2006)

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Pertencente a ordem Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae, o *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório, imóvel, não forma esporos e microaerófilo. Única micobactéria que possui tropismo pelas células do sistema reticuloendotelial e do sistema nervoso periférico, principalmente células de Schwann (SCOLLARD *et al.*, 2006; EICHELMANN *et al.*, 2013).

Em geral a parede celular de micobactérias possuem compostos importantes capazes de gerar uma resposta imune no hospedeiro. Mais especificamente, na *M. leprae* o lipídeo em maior quantidade na parede celular é o glicolipídio fenólico-I (PGL-I), capaz de gerar uma forte resposta de anticorpos IgM. Esta resposta é proporcional a carga bacteriana do paciente, podendo ser utilizada para acompanhar a efetividade da terapia farmacológica. (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase é uma doença endêmica em países tropicais, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Entre os países com maior número de relatos de novos casos destacam-se Índia, Brasil, Indonésia, Bangladesh e Nigéria. Considerando o constante aumento de viagens internacionais, pacientes com hanseníase podem ser encontrados em quase todas as partes do mundo (MS, 1962; WHO, 2018).

Nos anos 90, a OMS tinha como meta eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública até o ano 2000. A eliminação da doença foi definida como a redução da prevalência de casos para menos de 1 a cada 10000 habitantes, em

todos os países endêmicos. Entre os anos de 1985 e 2011, o número de casos registrados mundialmente caiu de 5,4 milhões para 219.075, com a prevalência caindo de 21,1 para 0,37 a cada 10000 habitantes. Estes dados não incluem a Europa (WHO, 2012).

No início de 2005, com os esforços globais, a hanseníase havia sido eliminada num grande número dos países exceto nove: Angola, Brasil, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal, República Centro-Africana, República Democrática do Congo e Tanzânia (WHO, 2012).

Como pode-se observar na Tabela 1, no período de 2008 e 2017, apesar de uma redução mundial dos casos novos de hanseníase, há uma tendência de manutenção das taxas de infecção nos países que possuem maior incidência da doença ao longo dos anos, destacam-se Índia e Brasil que em 2017 foram responsáveis por 63 e 13% dos casos de hanseníase no mundo (WHO, 2018).

O Brasil se comprometeu a empenhar-se no controle da doença, dentro de um prazo maior, até o ano de 2010 (para menos de 1 a cada 10000 habitantes). A partir de 2006, através do Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase (PNEH), foi oficializada a implantação da poliquimioterapia para todos os novos casos, e também a ênfase no diagnóstico precoce, com o objetivo de diagnosticar 90% dos novos casos antes do aparecimento de deformidades físicas (BRASIL, 2013; RIBEIRO; SILVA; OLIVEIRA, 2018).

O PNEH tem também como objetivo a promoção de alta dos pacientes por cura, em 80% dos casos que iniciaram tratamento e a redução da taxa de prevalência de 15 a 20% ao ano. Os municípios que receberam prioridade foram os dos estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará e Rondônia, além das regiões metropolitanas de Recife e Fortaleza. Entretanto, apesar dos esforços de todas as esferas do governo brasileiro, o objetivo não foi alcançado, e um novo prazo foi estabelecido, até 2020. (BRASIL, 2013; RIBEIRO; SILVA; OLIVEIRA, 2018).

No Brasil, durante o período de 2008 a 2016, foram notificados 301.322 casos de hanseníase em todo o país, sendo que a taxa geral de detecção anual de casos novos foi reduzida em 43,0%, passando de 21,5 para 12,3 a cada 100 mil habitantes. Vale-se notar também que em 2015 o Brasil atingiu um índice de prevalência da doença de 1 a cada 10 mil habitantes, adequando-se a meta proposta pela OMS (BRASIL, 2018; RIBEIRO; SILVA; OLIVEIRA, 2018).

TABELA 1 – OCORRENCIAS DE NOVOS CASOS DE HANSENIASE ENTRE 2008 e 2017 NOS PAISES COM MAIOR INCIDENCIA DE HANSENIASE

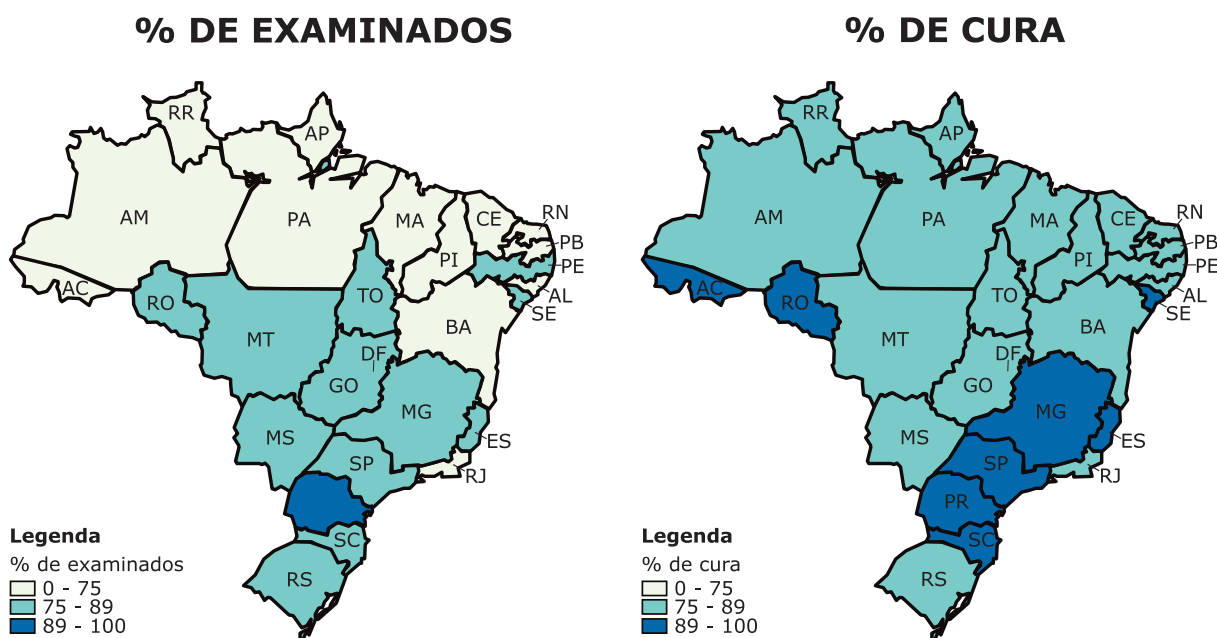
País	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Angola	1184	937	1076	508	431	850	NR	823	618	605
Bangladesh	5249	5239	3848	3970	3688	3141	3622	3976	3000	3754
Brasil	38914	37610	34894	33955	33303	31044	31064	26395	25218	26875
Comores	338	318	-	502	-	480	324	343	304	429
Costa do Marfim	998	884	-	770	1030	1169	910	891	895	773
Congo	6114	5062	5049	3949	3607	3744	3272	4237	3765	3649
Egito	797	700	680	649	644	-	564	583	651	543
Etiópia	4170	4417	4430	NR	3776	4374	3758	3970	3692	3114
Micronésia	124	122	177	196	252	195	178	164	169	141
Índia	134184	133717	126800	127295	134752	126913	125785	127326	135485	126164
Indonésia	17441	17260	17012	20023	18994	16856	17025	17202	16826	15910
Quiribati	42	96	182	111	94	137	123	180	218	187
Madagascar	1763	1572	1520	1577	1474	1569	1617	1487	1780	1430
Moçambique	1313	1191	1207	1097	758	NR	NR	1335	1289	1926
Myanmar	3365	3147	2936	3082	3013	2950	2877	2571	2609	2279
Nepal	4708	4394	3118	3184	3492	3225	3046	2751	3054	3215
Nigéria	4899	4219	3913	3623	3805	3385	2983	2892	2687	2447
Filipinas	2373	1795	2041	1818	2150	1729	1655	1617	1721	1908
Sudão do Sul	-	-	-	-	1801	576	691	-	-	-
Sri Lanka	1979	1875	2027	2178	2191	1990	2157	1977	1832	1877
Sudão	1901	2100	2394	706	727	677	684	624	624	551
Tanzânia	3276	2654	2349	2288	2528	2005	1947	2256	2047	1936
Total de casos em países prioritários	235132	229309	214577	210973	222079	206159	204282	202777	208491	199713
(%) dos casos totais	94,4	93,7	93,9	93,1	95,4	95,6	95,5	96,2	95,6	94,8
Total Global	249007	244796	228474	226626	232857	215656	213899	210758	217972	210671

Fonte: Adaptado de WHO, 2018.

A Figura 2, mostra que no período de 2008 a 2016, as regiões Norte e Nordeste foram as que apresentaram os piores desempenhos em número de casos examinados. Estas regiões e a região Centro-Oeste são as principais responsáveis pela carga endêmica do país. Nestas regiões os estados responsáveis pelos altos índices de prevalência no ano de 2015 foram Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, com taxa de prevalência respectivamente de 7,75, 4,2, e 3,76 casos a cada 10000 habitantes (BRASIL, 2018; RIBEIRO; SILVA; OLIVEIRA, 2018)

No mesmo período (2008 a 2016) todas as regiões apresentaram uma alta taxa de cura para a hanseníase, sendo que os estados apresentaram taxas maiores que 75%. Os estados que apresentaram melhor desempenho foram Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Santa Catarina, Sergipe, Rondônia e Acre, com taxas de cura maiores que 89%. Merece destaque o estado do Paraná, que apresentou um bom desempenho, com uma média de 91,4% de redução dos casos (BRASIL, 2018).

FIGURA 2 – PERCENTUAL DOS CASOS DE HANSENÍASE EXAMINADOS E CURADOS NO BRASIL NO PERÍODO DE 2008 A 2016



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2018.

A estratégia global para a Hanseníase (*Global Leprosy Strategy*), criada em 2016, estipulou metas para o combate à doença até 2020, baseando-se em três pilares: (WHO, 2018)

- Fortalecer a apropriação, coordenação e parcerias de instituições governamentais;
- Interromper o avanço da hanseníase e suas complicações;
- Acabar com a discriminação e promover inclusão dos portadores da doença.

As três principais metas estabelecidas para 2020 foram: zero novos casos de crianças com grau de incapacidade física 2 (GIF2), menos de 1 novo caso com este nível de incapacidade para cada 1 milhão de habitantes e nenhum país com leis ou legislações que permitam discriminação contra pessoas portadoras de hanseníase. Este projeto foi o primeiro a estabelecer uma meta a fim de reduzir a discriminação contra a hanseníase e às pessoas afetadas pela doença (WHO, 2018).

No Brasil as metas de redução de portadores da hanseníase com GIF2 ainda está longe de ser alcançada, apesar da redução significativa - cerca de 60% dos casos, alcançada entre 2008 e 2016, o Brasil ainda apresenta um alto número, 8,5 casos a cada um milhão de habitantes (BRASIL, 2018).

Também em 2016 foram atualizadas as diretrizes específicas para a vigilância, atenção e eliminação da hanseníase, rediscutindo ações de promoção e educação em saúde, busca ativa para diagnóstico precoce, tratamento oportuno, prevenção, tratamento e reabilitação de incapacidades físicas e vigilância de contatos, além de orientações voltadas para imunoprofilaxia com a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Essas novas diretrizes reafirmaram a importância da adoção de indicadores epidemiológicos de monitoramento da progressão da hanseníase como problema de saúde pública, além de indicadores operacionais para avaliar a qualidade dos serviços (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; SOUZA *et al.*, 2018).

2.4 TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE

Já tem sido estabelecido que pessoas que tem contato direto com pacientes portadores de hanseníase têm mais chances de desenvolver a doença, quando comparado a população geral, visto que a incidência de hanseníase em pessoas que possuem contato diário é dez vezes maior quando comparado com aos que não tem contato direto. Além do contato direto, outros fatores de risco são sugeridos como: o tipo de hanseníase do portador, idade e gênero, além da distância genética do portador. (MOET *et al.*, 2006; SAPRIADI; WANCI; SYAHRIDHA, 2019)

Deste modo, a principal fonte de contaminação é a coabitação com indivíduos não diagnosticados ou pacientes com tratamento inefetivo, apresentando carga bacteriana suficiente para o contágio. O modo de transmissão do *M. leprae* mais plausível é através da rota respiratória, visto que a secreção nasal de pacientes não tratados, e que possuem a forma lepromatosa da doença, contém um grande número de bacilos. A partir da contaminação do trato respiratório superior de um novo hospedeiro, pode ocorrer a disseminação total pelo corpo do indivíduo. (ABRAHAM *et al.*, 1998; SCOLLARD, 2016; BELDARRAÍN-CHAPLE, 2017)

Considerando o trato respiratório superior como o principal modo de transmissão, é plausível assumir que o *M. leprae* é capaz de evitar os mecanismos de defesa do tecido epitelial das vias aéreas, levando à colonização da mucosa nasal, permitindo assim a transmissão entre indivíduos por partículas e gotículas formadas na expiração. Através da infecção de macrófagos nas vias aéreas, o *M. leprae* pode ser levado ao resto do organismo por meio do sistema circulatório e linfático, atingindo assim tecidos mais favoráveis ao microrganismo, como o sistema nervoso periférico, levando aos sinais e sintomas característicos da doença (ARAUJO *et al.*, 2016).

Ocasionalmente a contaminação por *M. leprae* pode ocorrer através do leite materno e lesões na pele, visto que o microrganismo é capaz de atingir a superfície da pele através dos folículos capilares e glândulas sudoríparas, facilitando assim a transmissão através de contato longo e direto com portadores da doença. Considerando estes fatores, é possível reduzir a transmissão através de medidas de higiene pessoal, fatores socioambientais - como redução de superlotação e da má nutrição. (SCOLLARD, 2016; BELDARRAÍN-CHAPLE, 2017; SAPRIADI; WANCI; SYAHRIDHA, 2019)

Em geral, a maioria dos indivíduos não desenvolvem a doença após entrar em contato com o microrganismo, devido a resposta imune inata. Além disso, já foi demonstrado que a aplicação da vacina BCG é capaz de reduzir a transmissão da hanseníase, tanto na população geral quanto nos que entram em contato com os portadores da doença. (MOET *et al.*, 2006; SCOLLARD, 2016)

2.5 DIAGNOSTICO

A hanseníase deve ser considerada como provável diagnóstico no caso de lesões crônicas na pele e que não estejam respondendo ao tratamento padrão para

condições mais comuns, ou quando há perda sensorial nas lesões ou em extremidades. O diagnóstico é realizado normalmente com base nas manifestações clínicas da doença, principalmente em áreas em que a hanseníase é endêmica. Idealmente deve ser realizado uma biópsia da área afetada, a fim de confirmar a presença de bacilos ácido-resistentes (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2001; GOULART e GOULART, 2008).

Diferente de outras doenças infecciosas, a hanseníase é considerada uma doença marginal, conseqüentemente há uma baixa utilização de ferramentas diagnósticas modernas, como ELISA e PCR, devido ao custo, levando a uma acurácia baixa destas técnicas para a hanseníase. Deste modo, o diagnóstico da doença é realizado usualmente somando-se as manifestações clínicas a um achado laboratorial, resultando em diagnósticos após a manifestação da doença. O histórico de residência ou viagens do paciente em países endêmicos, devem ser levados em consideração ao se cogitar o diagnóstico de hanseníase (GOULART *et al.*, 2008; GOULART e GOULART, 2008).

As manifestações clínicas que caracterizam a hanseníase, além das lesões na pele com perda sensorial, incluem manchas hipopigmentadas ou avermelhadas na pele, parestesias, nódulos ou inchamento nos lóbulos auriculares e nervos periféricos aumentados e sensíveis. Dependendo do grau de evolução da doença, fraqueza das mãos associada a dedos em garra, pé pendente, paralisia facial, lagofalmo, perda de sobrancelhas e cílios, colapso narinário e perfuração do septo nasal podem ocorrer. Adicionalmente, devido à perda de sensibilidade, a presença de cortes ou queimaduras ausentes de dor são comuns (GOULART *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2017)

O envolvimento do sistema nervoso periférico ocorre em estágios iniciais da doença, evidenciado pela característica perda sensorial, elemento de diagnóstico. A confirmação precoce é essencial visto que um dos principais focos do tratamento é a prevenção e redução de danos nos nervos periféricos. É importante notar que a perda sensorial, apesar de mais comum, não é a única manifestação do comprometimento neuronal, alguns pacientes em fases mais tardias da doença podem apresentar dores neuropáticas (ARAUJO *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2017).

As ferramentas laboratoriais mais indicadas para o diagnóstico da hanseníase são o estudo histopatológico de biópsias da pele afetada e exames por PCR da mesma. Por meio da biópsia de pele realiza-se a determinação da profundidade e o tipo de infiltrado, além do comprometimento dos nervos periféricos. A biópsia deve ser

realizada nas bordas da lesão, região com maior atividade, por meio de uma simples coloração de hematoxilina e eosina é possível avaliar os danos causados pelo *M. leprae*. Esfregaços de pele, onde uma pequena incisão é feita nos lóbulos auriculares, cotovelos ou joelhos, apesar de ainda ser utilizada em áreas endêmicas, não é a técnica mais recomendada (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2001; GOULART *et al.*, 2008; GOULART e GOULART, 2008).

Através da utilização da PCR em amostras de pele é possível realizar a detecção do DNA *M. leprae* ou *M. lepromatosis*. A PCR não deve ser utilizada como uma ferramenta de detecção e sim como uma ferramenta de confirmação, quando as manifestações clínicas e estudos histológicos forem inconclusivos, visto que este exame apresenta baixa sensibilidade e especificidade nas fases iniciais da doença (GOULART *et al.*, 2008).

2.6 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENIASE

A classificação do tipo de hanseníase apresentada pelo paciente é essencial para a escolha do tratamento e duração do mesmo. Classificar erroneamente aumenta a chance de reincidência da doença, além de prolongar o tempo em que o paciente é capaz de transmitir o *M. leprae*. Ao longo dos anos, diversas classificações foram propostas para a hanseníase, as de maior importância e ainda utilizadas atualmente são a de Madrid (1953), Ridley e Jopling (1966) e da OMS (1982) (GASCHIGNARD *et al.*, 2016).

A classificação de Madrid é baseada nos aspectos clínicos da doença como o aspecto das lesões, características bacteriológicas (presença dos bacilos nas lesões), imunorreatividade à lepromina e características histológicas (tipo de infiltração e agrupamento dos bacilos). Com base nestes critérios, a doença é classificada em três classes: Tuberculóide (T), Dimorfa ou Borderline (B) e Lepromatosa ou Virchowiana (L). Esta classificação ainda é utilizada em alguns países como o Brasil (GASCHIGNARD *et al.*, 2016; RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Em 1966 Ridley e Jopling propuseram uma classificação mais precisa centrada nos achados imunológicos, além das manifestações cutâneas, motoras, sensoriais e avaliação da biópsia. Esta classificação possui como objetivo melhor descrever os pacientes que se encontram na fase dimorfa da doença, definindo assim

cinco subtipos: Tuberculóide-Tuberculóide (TT), Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB), Borderline-Lepromatosa (BL) e Lepromatosa-Lepromatosa (LL) (GASCHIGNARD *et al.*, 2016; JIN; AHN; AN, 2018).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico e o tratamento da hanseníase em locais com menos recursos e em hospitais móveis, em 1982 a OMS implementou uma classificação simplificada. Esta classificação se baseia, além das manifestações clínicas da doença, no índice baciloscópico (IB). O IB é calculado a partir de uma simples microscopia de imersão de esfregaços de pele, técnica simples e barata capaz de ser realizada rapidamente em qualquer local (GASCHIGNARD *et al.*, 2016).

Esta classificação de 1982 da OMS divide a doença em somente duas classes: Paucibacilar para pacientes com $IB < 2$ (Inclui pacientes classificados como TT e BT) e Multibacilar para pacientes com $IB \geq 2$ (Inclui pacientes classificados como BB, BL e LL) (GASCHIGNARD *et al.*, 2016).

Em 1996, a OMS optou por simplificar ainda mais a classificação da hanseníase, com o intuito de otimizar a distribuição e alocação do tratamento, classificando como paucibacilar pacientes com menos de cinco lesões cutâneas, enquanto pacientes com mais de seis lesões são classificados como multibacilar (GASCHIGNARD *et al.*, 2016; JIN; AHN; AN, 2018).

2.7 TRATAMENTO

O primeiro tratamento efetivo contra a hanseníase surgiu no início da década de 40, com a introdução da dapsona e seus derivados. Este foi um acontecimento de extrema importância na história da hanseníase, pois devido à falta de profilaxia contra a doença, o tratamento é essencial para a eliminação das fontes de infecção e interrompimento da cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2002; BELDARRAÍN-CHAPLE, 2017).

Devido ao surgimento de resistência a antibiótico em diversos casos de hanseníase tuberculóide após a aplicação da monoterapia, em 1981 a OMS instituiu a utilização da poliquimioterapia (PQT) para a hanseníase, recomendando a utilização da associação de dapsona e rifampicina para a forma tuberculóide (paucibacilar) da doença e da adição da clofazimina na forma lepromatosa (multibacilar). A utilização da PQT mostrou-se altamente efetiva, sendo capaz de rapidamente tornar o paciente

não infeccioso, além de, eficientemente, evitar a resistência medicamentosa quando comparada a monoterapia. (WHO, 1994; BRASIL, 2002)

O esquema terapêutico proposto pela OMS ainda é o mais efetivo e utilizado atualmente no Brasil. Para a forma tuberculóide da doença o tratamento é composto da combinação de uma dose mensal de 600 mg de rifampicina, sob administração supervisionada, e de doses diárias de 100 mg de dapsona. O tratamento para esta forma da doença possui uma duração de 6 a 9 meses. Para a forma lepromatosa, utiliza-se a mesma posologia para a rifampicina e dapsona, porém adiciona-se a clofazimina com uma dose mensal de 300 mg, supervisionada, e uma dose diária de 50 mg. Para esta forma da doença há também um aumento na duração do tratamento, de 12 a 18 meses (MOET *et al.*, 2006).

Como tratamento se segundas linhas podem ser utilizadas minociclina, ofloxacina, levofloxacina, claritromicina e moxifloxacina, porém a utilização destes medicamentos é baixa devido ao seu alto custo de produção, em geral maior que as drogas de primeira linha. Além disto, elas possuem eficácia reduzida, mesmo quando em combinação com drogas de primeira linha como a rifampicina (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; KAR; GUPTA, 2015).

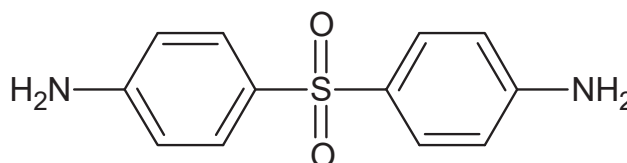
2.7.1 Dapsona

Introduzida em 1941 como uma alternativa ao tratamento da hanseníase com as demais sulfas, a dapsona, também conhecida como sulfona (4-4-diaminofenilsulfona) é um fármaco de baixo custo e é ainda parte fundamental do PQT para hanseníase. A dapsona atua primariamente como um bacteriostático, com uma baixa ação bactericida, sendo seu principal mecanismo de ação o antagonismo do ácido para-aminobenzóico (PABA) na enzima diidropteorato sintase, enzima esta essencial na rota sintética do ácido fólico (WILLIAMS *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2017).

A estrutura característica das sulfonas é um átomo de enxofre ligado a dois oxigênios por ligações duplas e a dois átomos de carbono, sendo a dapsona a sulfona de estrutura mais simples. A dapsona, com pKa de 2,41, é uma base fraca de Lewis sem um hidrogênio rapidamente dissociável. Sua aparência física é um pó branco cristalino (à temperatura ambiente), inodoro, que escurece quando em contato com a luz, porém permanece quimicamente estável (ZHU; STILLER, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A dapsona é uma molécula pequena, com peso molecular de 248,0619 g/mol. Devido a seu logP de 0,97, a dapsona é solúvel em álcool, metanol, acetona e ácido clorídrico, porém pouco solúvel em água (0,0099 mg/mL). Possui uma alta permeabilidade, porém a sua baixa solubilidade em água reduz seu potencial terapêutico, devido a sua baixa biodisponibilidade (GREBOGI, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2012)

FIGURA 3 – FORMULA ESTRUTURAL DA DAPSONA



Fonte: O autor, 2019

A dapsona é usualmente bem tolerada nas doses utilizadas para o tratamento da hanseníase. Suas reações adversas mais comuns incluem alergias como erupções cutâneas e bolhas, dermatite esfoliativa, icterícia, metemoglobinemia e, em casos mais graves, síndrome de hipersensibilidade a dapsona, caracterizada por um quadro de anemia hemolítica associada à metemoglobinemia e neuropatia periférica com déficit motor. Seu efeito adverso mais importante é a hemólise que, por meio da destruição de hematócitos, leva o paciente à anemia hemolítica. Este efeito é mais pronunciado em populações que possuem um déficit genético da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, que protege os hematócitos do stress oxidativo. (WILLIAMS *et al.*, 2014; GURAGAIN; UPADHAYAY; BHATTARAI, 2017)

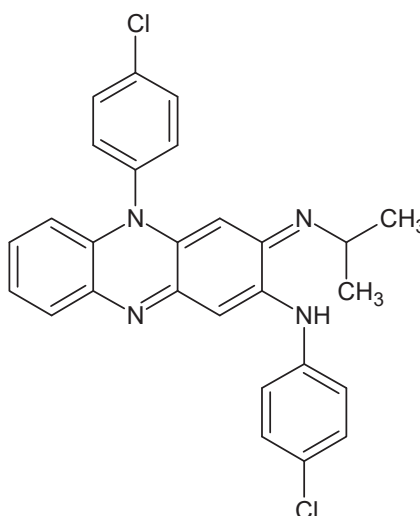
Desde sua introdução em 1941, a dapsona permaneceu como o único agente terapêutico utilizado no tratamento da hanseníase por três décadas e, devido ao seu uso prolongado, inadequado e interrupção precoce do tratamento, a utilização da monoterapia levou ao desenvolvimento de resistência do *M. leprae* ao fármaco. Em países endêmicos, como a Etiópia e o Brasil, casos de resistência a sulfonas atingem até 100 casos a cada 1000 pacientes tratados, enquanto a frequência de casos de bactérias resistentes a outras drogas como a rifampicina chega somente a 10 (CRUZ *et al.*, 2017; NAAZ *et al.*, 2017).

2.7.2 Clofazimina

Descrita originalmente em 1957, a clofazimina [3-(*p*-cloroanilino)-10-(*p*-clorofenil)-2,10-diidro-2-(isopropilimino) fenazina], é um fármaco derivado da fenazina, da classe dos riminofenazinas. Desenvolvido inicialmente como um corante, a clofazimina teve sua principal aplicação clínica em 1962, quando foi aprovada como parte da PQT para a hanseníase pela OMS (CHOLO *et al.*, 2011; BAIK *et al.*, 2013).

A clofazimina possui um peso molecular de 472,118 g/mol, é uma base fraca, com pKa de 8,51 e altamente lipofílica ($\log P > 7$). Possui três grupos funcionais amino prontamente ionizáveis quando em pH ácido. Devido a seu log P elevado, apesar de ter sua solubilidade em água levemente aumentada quando em pH ácido, é virtualmente insolúvel em água em pHs neutro e básico (BAIK; ROSANIA, 2012; CHOLO *et al.*, 2016).

FIGURA 4 – FORMULA ESTRUTURAL DA CLOFAZIMINA



Fonte: O autor, 2019.

Este fármaco possui uma baixa ação bactericida contra o *M. leprae*, levemente menor que a da dapsona. Seu mecanismo de ação ainda não é esclarecido, mas sabe-se que a clofazimina é capaz de se ligar no DNA do *M. leprae*, impedindo assim o crescimento bacteriano. Além de seu efeito bactericida, apresenta como vantagem a sua capacidade anti-inflamatória, sendo importante para o controle dos eritemas usualmente encontrados em pacientes (PRASAD *et al.*, 2009; CHOLO *et al.*, 2011; PAI, 2015).

Outro ponto importante é a lipofilicidade da droga. Sua alta afinidade por lipídeos permite que a mesma se acumule no tecido epitelial e nas extremidades nervosas, sítios onde o *M. leprae* usualmente atua. A clofazimina é capaz de se acumular em diversos órgãos como fígado, pulmões, glândulas adrenais, rins, nódulos linfáticos, tecidos cutâneos e tecido adiposo e epitelial da pele e do sistema gastrointestinal, sendo estes dois últimos órgãos responsáveis pelos principais efeitos adversos da droga. (CHOLO *et al.*, 2011; PAI, 2015)

Devido ao seu acúmulo nos tecidos, a clofazimina causa uma descoloração da pele a qual é dose dependente, resultando em uma pigmentação marrom-avermelhada do tecido cutâneo e conjuntivo, xerose e hipersensibilidade à luz, sendo estes seus maiores limitadores para o uso em larga escala da clofazimina. Esta característica da droga resulta em uma meia-vida longa, superior a 70 dias, sendo que a lenta excreção completa da droga leva de 6 a 12 meses, resultando em um longo período para que o paciente recupere sua coloração normal. (CHOLO *et al.*, 2011; PAI, 2015; CHAVES *et al.*, 2018)

O efeito da clofazimina no sistema gastrointestinal pode ser de leve a moderado, se manifestando como dores abdominais ou epigástricas, náusea, diarreia, vômito e intolerância gastrointestinal, e em casos mais graves, porém menos frequentes, infarto esplênico, obstrução intestinal e sangramento, podendo ser ocasionalmente fatal. Apesar do mecanismo de resistência bacteriana da clofazimina estar sob investigação por diversos anos, este ainda não é esclarecido. A taxa de resistência do *M. leprae* a clofazimina também é desconhecida, porém é aparentemente baixo (CHOLO *et al.*, 2011; BELTRÁN-ALZATE *et al.*, 2016; NAAZ *et al.*, 2017).

2.8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Métodos bioanalíticos podem ser definidos como métodos analíticos utilizados para a determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas. Os métodos bioanalíticos para a determinação de fármacos são de extrema importância para a avaliação e interpretação de estudos de biodisponibilidade, bioequivalência, farmacocinética e toxicologia. A qualidade destes estudos está diretamente ligada a qualidade dos métodos desenvolvidos, entretanto, a otimização dos métodos não

garante o seu desempenho adequado, sendo necessário a demonstração de sua adequabilidade (ICH, 2005; SHAH, 2007; USP, 2011; BRASIL, 2012).

O objetivo da validação é garantir, através de estudos experimentais, que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida. Portanto, é essencial para a obtenção de resultados confiáveis que os princípios de validação sejam estabelecidos e aplicados aos métodos bioanalíticos de acordo com as regulamentações vigentes (ICH, 2005; SHAH, 2007; USP, 2011; BRASIL, 2012).

De acordo com as legislações vigentes, como a RDC ° 27/2012 de 14 de maio de 2012 da ANVISA, os parâmetros utilizados para a realização da validação de métodos bioanalíticos são: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, efeito matriz, efeito residual e estabilidade (ICH, 2005; SHAH, 2007; USP, 2011; BRASIL, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIAS QUIMICAS

Os padrões analíticos de clofazimina, (Lote: 1047) e mebendazol (Lote: 1013) foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (Manguinhos, Brasil) e o padrão analítico de dapsona (Lote: BCBX0187) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

3.2 SOLVENTES E REAGENTES

Acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético (grau CLAE) foram obtidos da Tedia (Ohio, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) P.A., ácido fórmico 98%, acetato de etila e clorofórmio da Merck (Milford, EUA), éter metil-terc-butílico (MTBE) da Vetec (RJ, Brasil), acetato de amônio 97% da J.T.Baker (México), ácido acético grau farmacêutico, formiato de amônio 97% e formiato de metila da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A água ultra- purificada foi obtida no sistema de purificação Milli-Q® Gradient A10 – Millipore (Milford, EUA).

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO

Os plasmas brancos normais, lipêmicos e hemolisados utilizados no desenvolvimento e validação do método foram obtidos de doação pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil)

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

As soluções estoque foram preparadas separadamente de modo a se obter uma concentração final de 0,5 mg/mL de clofazimina e mebendazol e 1,0 mg/mL de dapsona. As soluções estoque de clofazimina e dapsona foram preparadas utilizando acetonitrila como solvente, enquanto para a solução de mebendazol (PI) foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de trabalho foram preparadas através da diluição apropriada das soluções estoque em acetonitrila para cada experimento.

3.5 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto por uma bomba binária (G1213B), degaseificador (G1379B) e forno de coluna (G1316B). Conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), mantido a temperatura de 5 °C.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo API 3200 (Applied Biosystems, Toronto, Canadá), utilizando a fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo positivo de ionização.

Para separação cromatográfica foi utilizada uma coluna XTerra® MS C18 2,1 x 150 mm, 3,5 µm (Waters Corporation, Mildford, EUA), com fase móvel composta por água/acetoneitrila/ácido fórmico (40/60/0.1; v/v/v) sendo eluída em modo isocrático com fluxo de 400 µL/min. O sistema foi mantido a uma temperatura de 40 °C e o volume de injeção utilizado foi de 10 µL.

Os parâmetros espectrométricos e os parâmetros da fonte de ionização estão apresentados nos Quadros 1 e 2 respectivamente.

QUADRO 1 – PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS OTIMIZADOS

Composto	Ion Molecular (m/z)	Transição (m/z)	Dwell Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Clofazimina	473,2	473,2 - 431.1	150	76	8	22	41	34
		473,2 - 395.2	150	76	8	22	59	32
Dapsona	249,2	249,2 - 156.1	150	21	10	16	19	4
		249,2 - 108.2	150	21	10	16	29	4
Mebendazol	296,2	296,2 - 264.1	150	56	4.5	16	33	22
		296,2 - 105.1	150	56	4.5	16	43	4

DP: potencial de desagrupamento; EP: Potencial de entrada; CEP: potencial de entrada na cela de colisão; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da cela de colisão.

Fonte: O autor, 2019

QUADRO 2 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS

Parâmetro	Valor
Gás de interface (CUR)	12 psi
Gás de colisão (CAD)	6 psi
Voltagem do Capilar (IS)	5500 V
Temperatura (TEM)	450 °C
Gás de nebulização (GS1)	50 psi
Gás auxiliar (GS2)	50 psi

Fonte: O autor, 2019

O gás utilizado no espectrômetro de massas foi nitrogênio de alta pureza produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Os dados foram obtidos e processados através do software Analyst 1.6 (ABI Sciex, EUA).

3.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALITICO

3.6.1 Otimização dos parâmetros espectrométricos

Inicialmente foi realizado a otimização dos parâmetros espectrométricos, e para isto foram preparadas duas soluções de trabalho contendo os analitos e o PI, sendo uma solução de Água:Acetonitrila (50:50; v/v) com 0,1% de ácido fórmico e outra com 3 mM de formiato de amônio. Estas soluções foram introduzidas através da bomba seringa Havard 22 Dual Model (Havard Apparatus, Syng Natick, EUA) no espectrômetro de massas por infusão direta, em um fluxo de 10 μ L/min.

A ionização por *Electrospray* (ESI) foi utilizada para a análise dos compostos de interesse, durante os experimentos de infusão o capilar foi mantido na posição de 10mm na vertical e 5 mm na horizontal, de acordo com as especificações do fabricante.

O sinal dos analitos em ambas as soluções foram avaliados nos modos positivo e negativos de ionização, a fim de estabelecer o modo de ionização, concentração e aditivo mais adequado para a análise por espectrometria de massas, com intensidade de sinal entre $2e^5$ e $1e^6$ necessária para a realização da otimização dos parâmetros espectrométricos.

A otimização dos parâmetros, potencial de desagrupamento (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na cela de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP), foi realizada automaticamente pelo equipamento, estabelecendo o monitoramento de reações múltiplas (MRM) a ser utilizado a partir dos dois fragmentos mais intensos para cada analito e para o padrão interno.

Utilizando os parâmetros espectrométricos estabelecidos foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, gás de interface (CUR), gás de colisão (CAD), gás de nebulização (GS1), gás auxiliar (GS2), voltagem do capilar (IS) e temperatura da fonte (TEM), através da Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Para isto o cromatógrafo foi acoplado diretamente ao espectrômetro de massas, sem a utilização de uma coluna cromatográfica. Foi utilizado como fase móvel água/acetonitrila/ácido fórmico (50:50:0,1; v/v), em um fluxo de 200 µL/min, volume de injeção de 10 µL e alterou-se o capilar para a posição de 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal, de acordo com as especificações do fabricante.

3.6.2 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Para o desenvolvimento do método bioanalítico diversas condições cromatográficas foram testadas, a fim de se obter a condição ideal, com melhor retenção e resolução dos compostos.

Foram testadas as seguintes colunas:

- XTerra® MS C18 2,1 x 150 mm, 3,5 µm
- X-Bridge™ C18 2,1 x 150 mm, 3,5 µm
- Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 mm, 5 µm

Como fase móvel foram testadas misturas de água, acetonitrila e metanol em diversas proporções. Foram testados diferentes aditivos para a fase móvel com o intuito de se obter diferentes forças iônicas e pH, sendo estes o ácido fórmico, formiato de amônio, ácido acético, acetato de amônio e bicarbonato de amônio.

3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Para a avaliação da extração, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram pipetadas para um tubo *Eppendorf* de 2 mL, e em seguida foram adicionados 20 µL

de uma mistura das soluções de trabalho (em concentrações de 10 µg/mL) de modo a se obter uma concentração final de 1 µg/mL dos analitos e PI.

Após fortificação, as amostras foram homogeneizadas por 2 min em vórtex. Em seguida estas foram submetidas aos seguintes protocolos de extração, (a) precipitação de proteínas e (b) extração líquido-líquido

(a) Precipitação de proteínas: Uma alíquota de 580 µL dos diferentes solventes testados foram adicionadas ao tubo *Eppendorf* contendo o plasma fortificado. A amostra foi agitada durante 2 min em vórtex e em seguida submetida a centrifugação por 10 min a 14000 rpm, sob temperatura de 4 °C (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha). Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um vial de 1,5 mL para a análise por CLAE-MS/MS. Foram testados os seguintes solventes:

- Acetonitrila;
- Metanol;
- Solução de Ácido Fórmico 1% em água;
- Solução de Ácido Fórmico 1% em acetonitrila;
- Solução de Ácido Fórmico 1% em Metanol;
- Solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) 1% em água;
- Solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) 1% em acetonitrila;
- Solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) 1% em Metanol;
- Solução de Ácido Tricloroacético (TCA) 1% em Metanol.

(b) Extração líquido-líquido, alíquotas de 600 µL dos diferentes solventes descritos acima foram adicionadas ao tubo *Eppendorf* contendo o plasma fortificado. Em seguida as amostras foram agitadas durante 2 min em vórtex e em seguida submetidas a centrifugação por 10 min a 14000 rpm, sob temperatura de 4 °C. Após centrifugação uma alíquota de 580 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo *Eppendorf* e evaporada até *secura* à 40 °C no concentrador de amostras *CentriVap*, Labconco (Kansas City, EUA). O resíduo remanescente foi ressuspenso em 600 µL de acetonitrila, agitado por 3 min em vórtex seguido de centrifugação por 3 min a 14000 rpm, sob temperatura de 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um vial de 1,5 mL para a análise por CLAE-EM/EM. Os solventes testados foram os seguintes:

- Éter de petróleo;
- Éter metil-terc-butílico (MTBE);

- Clorofórmio;
- Acetato de Etila;
- Formiato de Metila.

3.8 PREPARO SOLVENTE EXTRATOR

O solvente extrator a ser utilizado no preparo de amostras foi preparado diluindo-se uma alíquota de solução estoque de mebendazol em uma solução de Água:Acetonitrila (50:50, v/v), a fim de se obter uma concentração final de mebendazol, no solvente extrator de 0,6892 µg/mL. Quando adicionado ao plasma resulta em uma concentração final de 0,5 mg/mL de mebendazol.

3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de plasma foram extraídas através da técnica de precipitação de proteínas. Para isto uma alíquota de 580 µL de solução extratora e 20 µL de acetonitrila foram adicionadas em um tubo *Eppendorf* contendo 200 µL de amostra de plasma. Em seguida foi agitada durante 2 min em vórtex e em seguida submetida a centrifugação por 10 min a 14000 rpm, sob temperatura de 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para um vial de 1,5 mL para a análise por CLAE-EM/EM.

3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método bioanalítico por CLAE-EM/EM foi validado de acordo com a norma vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RE nº 27 de 17 de maio de 2012 (Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos) e a norma vigente do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Fármacos de uso Humano (ICH). Segundo estes guia, para ser considerado adequado para sua finalidade, o método deve ser avaliado nos seguintes requisitos: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e exatidão (ICH, 2005; BRASIL, 2012).

3.10.1 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram avaliados pela análise de diluições sequenciais de amostras fortificadas até que os picos dos analitos de interesse não fossem mais visíveis. O LD foi determinado como a menor concentração encontrada que possuísse uma relação sinal/ruído maior que 3, enquanto para o LIQ foi escolhida a menor concentração que possuísse relação sinal/ruído maior que 10, além de atender os critérios de precisão e exatidão.

3.10.2 Seletividade

A seletividade foi determinada através da comparação de matrizes. As amostras isentas de analitos foram preparadas adicionando-se alíquotas de 200 µL de plasma e 20 µL de acetonitrila em tubo *Eppendorf* e em seguida extraídos conforme descrito no tópico 3.9. As amostras fortificadas foram preparadas de acordo com o tópico 3.10.4. Para a avaliação da seletividade foram utilizadas quatro amostras de plasma normal, uma amostra de plasma lipêmico e uma amostra de plasma hemolisado.

Os cromatogramas obtidos das matrizes isentas de analitos foram comparados com os de plasma fortificado no limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas de picos interferentes obtidas na matriz isenta em tempos de retenção próximos ao do analito de interesse, devem ser inferiores a 20% da resposta do analito no LIQ. Para o padrão interno (PI), a resposta de picos interferentes deve ser inferior a 5% da resposta do PI.

3.10.3 Curva de calibração

O método utilizado para a determinação da linearidade foi o da padronização interna. Foram avaliadas curvas analíticas, compostas por oito pontos, preparadas em quintuplicatas durante três dias consecutivos. Para o preparo da curva, alíquotas de 200 µL de plasma normal foram transferidas para tubos *Eppendorf* e fortificadas com 20 µL de soluções de trabalho dos analitos, para se obter os 8 níveis de concentração descritos na Quadro 3.

QUADRO 3 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALITICAS DE CLOFAZIMINA E DAPSONA

Níveis de Concentração (µg/mL)								
Compostos	1	2	3	4	5	6	7	8
Clofazimina	0,050	0,063	0,325	1,250	2,500	3,125	3,750	5,000
Dapsona	0,100	0,125	0,650	2,500	5,000	6,250	7,500	10,000

Nota: Concentração de mebendazol (PI) 500 µg/mL em todos os níveis.

Fonte: O autor, 2019

Para cada um dos compostos uma curva de calibração foi gerada, a fim de avaliar a relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta do equipamento. As curvas de calibração foram geradas plotando-se a área dos picos dos analitos corrigida pela área do pico do padrão interno *versus* as concentrações dos analitos corrigidas pela concentração do padrão interno. A construção das curvas foi feita através do modelo matemático dos mínimos quadrados ponderados, utilizando $1/x$ como peso. Como parâmetros da regressão foram calculados o ângulo, o intercepto, coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação (r^2), foram calculados também para cada nível de concentração dos dois compostos o coeficiente de variação (DPR%) e o erro padrão relativo (EPR%).

Para a aprovação das curvas, os níveis de concentração, as variações de precisão (DPR%) e exatidão (EPR%) não devem exceder 15%. Para a concentração nominal do LIQ permite-se uma variação de até 20%. O coeficiente de correlação (r) da curva obtida deve ser igual ou superior a 0,98. É necessário também que no mínimo 75% dos padrões de calibração atendam estas especificações (ICH, 2005; BRASIL, 2012).

3.10.4 Amostra de controle de qualidade

O preparo das amostras de controle de qualidade (CQ) foi realizada de maneira semelhante as da curva de calibração (tópico 3.10.3). Foram preparados em quintuplicatas controles do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ) e controles de baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) concentrações, como descrito na Quadro 4.

As amostras do controle de qualidade de diluição (CQD) foram preparadas de maneira distinta aos outros controles, sendo sua concentração definida como 10 vezes a concentração nominal do CQM, com o intuito de se obter uma concentração

que ultrapassasse a concentração do LSQ. Sendo assim, alíquotas de 180 µL plasma branco foram fortificadas com 20 µL da solução de trabalho e em seguida agitadas em vórtex por 3 min. Para realização da análise foram realizadas diluições na proporção 1:10, 20 µL de plasma fortificado e 180 µL de plasma branco, e novamente submetidas a agitação por 3 min. Em seguida as amostras diluídas foram preparadas conforme descrito no item 3.9 para a realização das análises por CLAE-EM/EM.

QUADRO 4 – CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS NOS CONTROLES DE QUALIDADE

Níveis de Concentração (µg/mL)					
Compostos	CQ-LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
Clofazimina	0,050	0,063	2,500	3,750	25,000
Dapsona	0,100	0,125	5,000	7,500	50,000

Nota: CQ-LIQ: Controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição.

Fonte: O autor, 2019.

Para as amostras de controle de qualidade serem aprovadas, no mínimo 67% de todos os CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração não podem apresentar um desvio ou erro padrão superiores a 15% de seus valores nominais (ICH, 2005; BRASIL, 2012).

3.10.5 Precisão e Exatidão

A avaliação da precisão e exatidão foi realizada durante três dias consecutivos (interdia e intradia) através da análise de cinco réplicas diárias das concentrações de controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), preparadas conforme descrito na seção anterior (tópico 3.10.4).

A determinação da precisão foi realizada por meio da avaliação do coeficiente de variação (DPR%) entre as áreas obtidas de cada composto em um mesmo nível de concentração. O cálculo do DPR foi realizado de acordo com a Equação 1. A exatidão foi estimada calculando-se o erro padrão relativo (EPR%), obtido a partir da concentração teórica e da concentração experimental obtida para cada composto, o cálculo para este parâmetro está apresentado na Equação 2. Os erros de precisão e

exatidão observados devem ser inferiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ que pode variar em até 20% (BRASIL, 2012).

EQUAÇÃO 1 – CALCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO

$$DPR\% = \frac{\text{Desvio Padrão Experimental}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100$$

EQUAÇÃO 2 – CALCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO

$$EPR\% = \frac{(\text{Concentração Média Experimental} - \text{Valor Nominal}) \times 100}{\text{Valor Nominal}}$$

3.10.6 Recuperação

Para a realização do ensaio de recuperação foram realizadas comparações de amostras de matriz de plasma fortificadas com os analitos de interesse e PI antes da extração (AE) e de amostras de matriz extraídas e fortificadas posteriormente com os analitos de interesse e PI (AF).

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração (CQB, CQM e CQA) em quintuplicata, nas mesmas concentrações descritas na Tabela 3. As amostras do grupo AE foram preparadas de acordo com o descrito no tópico 3.10.4. As amostras do grupo AF foram preparadas de maneira semelhante, porém não foi realizada a adição das soluções de trabalho, sendo esta substituída por 20 µL de acetonitrila pura. Após realizada a extração das amostras AF, foi realizada a adição de 20 µL das soluções de trabalho a fim de se atingir as concentrações desejadas (CQB, CQM e CQA).

A recuperação foi estimada por meio da razão entre a quantidade do analito encontrada nas amostras AE e da quantidade de analito encontrada nas amostras AF. O Cálculo da recuperação está apresentado na Equação 2.

EQUAÇÃO 3 – CALCULO DA RECUPERAÇÃO OBTIDA EXPERIMENTALMENTE

$$\text{Recuperação}\% = \frac{\text{Concentração do analito extraído}(AE) \times 100}{\text{Concentração do analito fortificado}(AF)}$$

3.10.7 Efeito Matriz

A avaliação da presença de efeito matriz foi realizada em quatro alíquotas de 200 µL de plasma normal, duas alíquotas de plasma lipêmicos e duas alíquotas de plasma hemolisado, sendo todos de lotes distintos. As amostras foram preparadas de acordo com o item 3.10.4 em dois níveis de concentração (CQB e CQA). Os resultados obtidos destas amostras foram comparados com os resultados obtidos de soluções dos analitos e PI em acetonitrila nas mesmas concentrações.

Esta comparação foi realizada através do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), para cada nível de concentração. O cálculo do FMN está apresentado na Equação 4.

EQUAÇÃO 4 – CALCULO DO FATOR MATRIZ NORMALIZADO

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do Analito em Matriz}}{\text{Resposta do PI em Matriz}}}{\frac{\text{Resposta do Analito em Solução}}{\text{Resposta do PI em Solução}}}$$

O efeito matriz é considerado não significativo quando o desvio (DPR%) dos FMN relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

3.10.8 Efeito Residual

A avaliação do efeito residual foi realizada através da injeção de uma amostra de plasma branco, seguida da injeção de uma amostra de plasma fortificado na concentração do LSQ, e por último, a mesma amostra de plasma branco foi injetada mais duas vezes. Os resultados obtidos das injeções das amostras de plasma branco foram avaliados e comparados com os resultados obtidos das amostras do CQ-LIQ. Para ser considerado como ausente de efeito residual, as respostas dos potenciais

picos interferentes presentes nas amostras, nos mesmos tempos de retenção dos analitos e PI, devem ser inferiores a 20% e 5% das respostas das amostras do CQ-LIQ, para os analitos e PI respectivamente.

3.10.9 Estabilidade

3.10.9.1 Estabilidade dos analitos em plasma

Para os ensaios de estabilidade em plasma, alíquotas suficientes de 200 μL de plasma branco foram fortificadas com 20 μL de soluções de trabalho contendo os analitos, a fim de se obter amostras com os analitos em concentrações correspondentes ao CQB e CQA. As amostras foram então agitadas em vórtex durante 3 min.

O primeiro teste de estabilidade realizado foi o de curta duração. As amostras fortificadas, em triplicata, foram mantidas sobre bancada a temperatura de 22 °C por 6 h. Após decorrido o tempo, as amostras foram processadas de acordo com o tópico 3.9 e por fim analisadas.

Para o ensaio de estabilidade após ciclos de congelamento, as amostras fortificadas foram congeladas por 12 h a -40 °C, então descongeladas a temperatura ambiente. Após totalmente descongeladas, as amostras foram congeladas e descongeladas nas mesmas condições sucessivamente, até completar três ciclos de congelamento e descongelamento. Após finalizado os ciclos de congelamento, as amostras foram processadas de acordo com o tópico 3.9 e então analisadas.

Para a realização do teste de estabilidade de longa duração as amostras fortificadas foram armazenadas congeladas a -40 °C por um período de 30 dias. Após este período as amostras foram processadas de acordo com o item 3.10.4 e então analisadas.

O teste de estabilidade de pós - processamento foi realizado com amostras fortificadas e processadas, que permaneceram no gerenciador de amostras por 8h a 5 °C de acordo com o item 3.10.4.

As amostras foram consideradas estáveis quando as respostas obtidas possuíam uma variação menor do que 15% do valor nominal, a concentração experimental foi estimada utilizando uma curva de calibração recém preparada.

3.10.9.2 Estabilidade dos analitos em solução

A análise de estabilidade em solução estoque foi realizada em soluções estoque dos analitos e em soluções de trabalho, preparadas de acordo com o item 3.4. As soluções estoque foram armazenadas durante 30 dias em *freezer* a -40 °C. Parte das soluções de trabalho foram armazenadas durante 72 h em geladeira a 4 °C, outra parte das soluções de trabalho foi mantida durante 6 h sobre a bancada em temperatura ambiente.

Decorrido os tempos estipulados estas soluções foram diluídas e utilizadas para fortificar amostras de plasma branco, a fim de atingir as concentrações dos níveis CQA e CQB. Estas amostras foram então processadas de acordo com o tópico 3.10.4 e então analisadas.

As soluções foram consideradas estáveis quando apresentaram erros menores do que 10%, em relação a concentração nominal de soluções recém preparadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

4.1.1 Otimização dos parâmetros espectrométricos

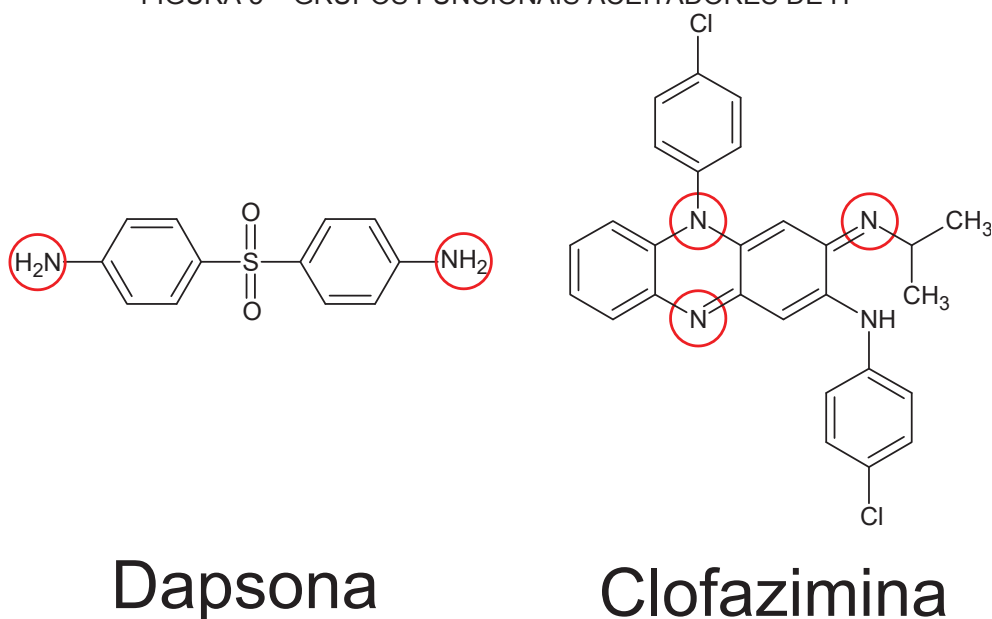
Para iniciar o desenvolvimento do método analítico foi realizada a otimização dos parâmetros espectrométricos, por meio da infusão direta de soluções contendo padrões dos analitos no espectrômetro de massas. A fonte de ionização escolhida como interface entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro foi a de *electrospray*, devido sua capacidade de ionizar compostos de média e alta complexidade na presença de matrizes complexas como o plasma.

Para definir o modo de ionização a ser utilizado, as soluções dos analitos foram analisadas tanto no modo positivo quanto negativo utilizando os parâmetros espectrométricos padrão do equipamento (Quadro 5). Primeiramente foi realizada a formação do íon molecular utilizando somente o primeiro dos quadrupolos. Para ambos os analitos o modo positivo se mostrou mais sensível, isto é explicado pela presença de grupos funcionais, como aminas, capazes de aceitar prótons (H^+) presentes em ambos os compostos e pela ausência de grupos capazes de doar H^+ , como mostrado na Figura 5.

QUADRO 5 – PARÂMETROS ESPECTROMÉTRICOS PADRÃO DO EQUIPAMENTO

Parâmetro	Valor
Gás de interface (CUR)	10 psi
Voltagem do Capilar (IS)	5500 V
Temperatura (TEM)	0 °C
Gás de nebulização (GS1)	15 psi
Potencial de desagrupamento (DP)	40 V
Potencial de entrada (EP)	10 V

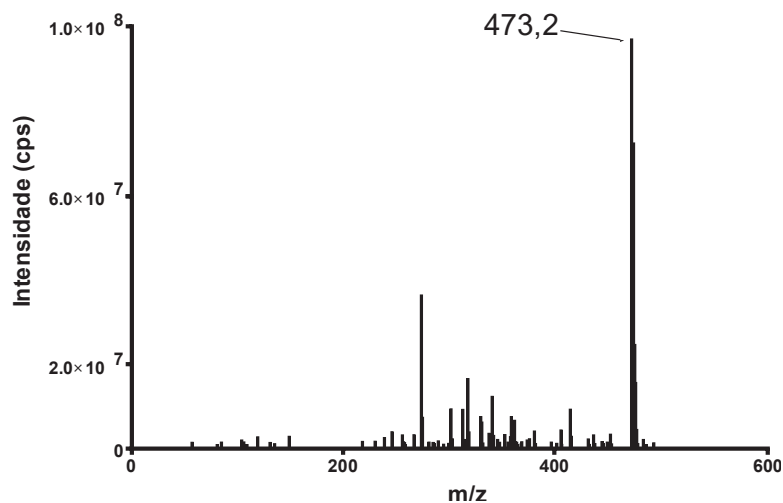
Fonte: O autor, 2019

FIGURA 5 – GRUPOS FUNCIONAIS ACEITADORES DE H⁺

Fonte: O Autor, 2019

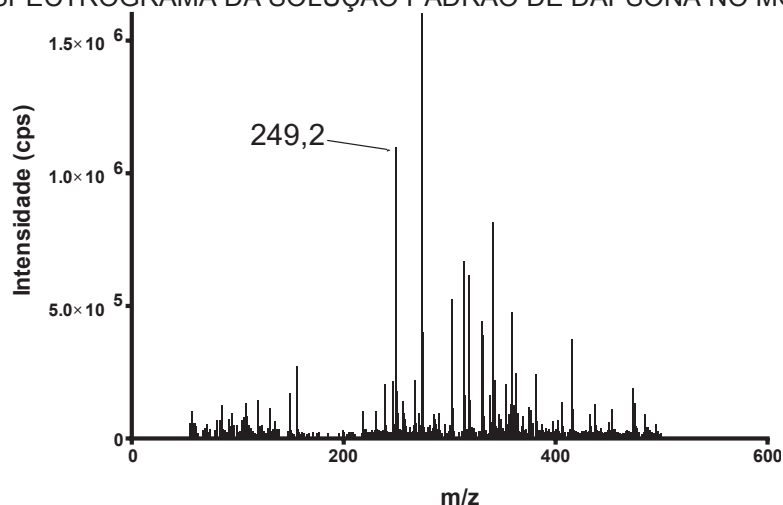
Os espectrogramas encontrados para as soluções de clofazimina e dapsona estão apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

FIGURA 6 – ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLOFAZIMINA NO MODO POSITIVO



Nota: Solução de 500 µg/mL de clofazimina em Água:Acetonitrila:Ácido Fórmico (50:50:0.1; v/v/v)
Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 7 – ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DAPSONA NO MODO POSITIVO



Nota: Solução de 500 µg/mL de dapsona em Água:Acetonitrila:Ácido Fórmico (50:50:0.1; v/v/v)
Fonte: O autor, 2019.

Tendo definido o melhor modo de ionização para os compostos de interesse foi realizada a análise de fragmentação para a confirmação da identidade dos íons moleculares encontrados. A avaliação da fragmentação foi realizada utilizando os parâmetros espectrométricos padrão do equipamento (Quadro 6).

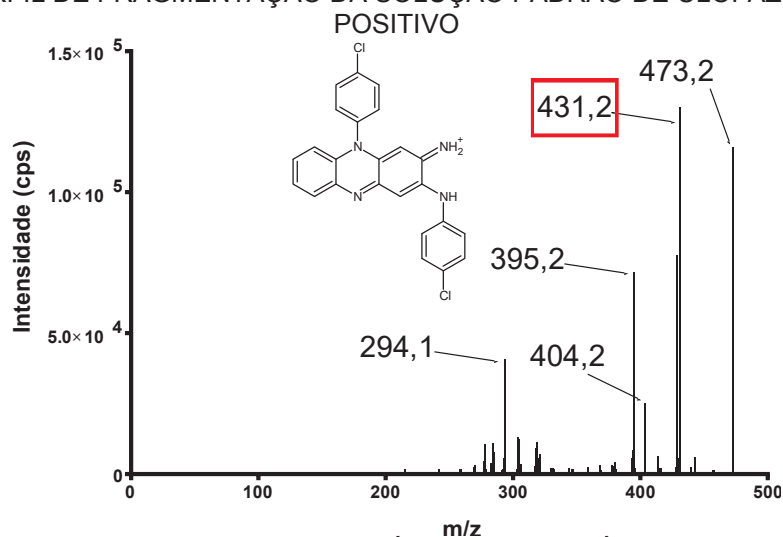
QUADRO 6 – PARAMETROS ESPECTROMETRICOS PADRÃO DO EQUIPAMENTO

Parâmetro	Valor
Gás de interface (CUR)	5 psi
Gás de colisão (CAD)	50 psi
Voltagem do Capilar (IS)	5500 V
Temperatura (TEM)	0 °C
Gás de nebulização (GS1)	50 psi
Gás auxiliar	50 V
Potencial de desagrupamento (DP)	10 V
Potencial de entrada (EP)	25 V
Energia de colisão (CE)	3,8 V
Potencial de saída da célula de colisão (CXP)	10 V

Fonte: O autor, 2019

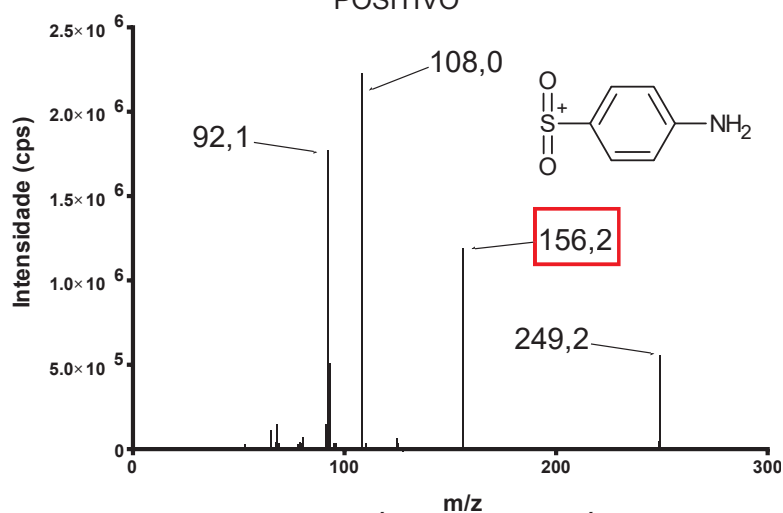
Os perfis de fragmentação obtidos para as soluções padrão de clofazimina e dapsona, estão ilustrados nas Figuras 8 e 9.

FIGURA 8 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLOFAZIMINA NO MODO POSITIVO



Nota: Solução de 500 µg/mL de clofazimina em Água:Acetonitrila:Ácido Fórmico (50:50:0.1; v/v/v)
Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 9 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DAPSONA NO MODO POSITIVO



Nota: Solução de 500 µg/mL de dapsona em Água:Acetonitrila:Ácido Fórmico (50:50:0.1; v/v/v)
Fonte: O autor, 2019.

Os fragmentos encontrados para ambos os compostos de interesse estão de acordo com os encontrados previamente na literatura (HADJIGEORGIOU *et al.*, 2009; KAKLAMANOS; THEODORIDIS, 2012; BONDE *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018). Os íons moleculares e os fragmentos encontrados estão contidos no Quadro 7

QUADRO 7 – ÍONS MOLECULARES E FRAGMENTOS ENCONTRADOS

Composto	Massa molecular	Íon Molecular	Fragmentos
Clofazimina	472,1	473,2	294,1; 395,2; 404,2; 431,2
Dapsona	248,1	249,2	92,1; 108,0; 156,2

Fonte: O Autor, 2019

A próxima etapa realizada foi a otimização automática dos parâmetros espectrométricos do equipamento para a confecção do método de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Foi realizada a otimização automática para os dois fragmentos de íons mais intensos para cada composto, sendo que o de maior intensidade foi utilizado para a quantificação, enquanto o segundo maior em intensidade para a qualificação dos compostos. Os resultados obtidos na otimização para os compostos de interesse e para o PI estão sumarizados no Quadro 8.

QUADRO 8 – PARAMETROS ESPECTROMÉTRICOS OTIMIZADOS

Composto	Ion Molecular (m/z)	Transição (m/z)	Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Clofazimina	473.118	473,1 – 431,1	150	76	8	22	41	34
		473,1 – 395,2	150	76	8	22	59	32
Dapsona	249.198	249,2 – 156,1	150	21	10	16	19	4
		249,2 – 108,2	150	21	10	16	29	4
Mebendazol	296.188	296,2 – 264,1	150	56	4.5	16	33	22
		296,2 – 105,1	150	56	4.5	16	43	4

DP: potencial de desagrupamento; EP: Potencial de entrada; CEP: potencial de entrada na cela de colisão; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da cela de colisão.

Fonte: O autor, 2019

A última etapa foi a realização da otimização dos parâmetros da fonte de íons, para isto o CLAE foi acoplado ao espectrômetro de massas, sem coluna cromatográfica, e foi realizada a análise por injeção em fluxo, para isto foram feitas injeções de uma solução contendo os analitos e o PI sob constante fluxo de fase móvel (água:acetonitrila 50:50 v/v contendo 0,1% de ácido fórmico) a 400 µL/min. Os parâmetros foram otimizados automaticamente pelo equipamento e os resultados estão apresentados no Quadro 9.

QUADRO 9 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS

Parâmetro	Valor
Gás de interface (CUR)	12 psi
Gás de colisão (CAD)	6 psi
Voltagem do Capilar (IS)	5500 V
Temperatura (TEM)	450 °C
Gás de nebulização (GS1)	50 psi
Gás auxiliar (GS2)	50 psi

Fonte: O autor, 2019

4.1.2 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Como primeiro passo na otimização dos parâmetros cromatográficos foi realizada a escolha da coluna. A maioria dos métodos disponíveis na literatura utilizam fase reversa como o método cromatográfico de escolha, como apresentado no Quadro 10.

Foram testadas inicialmente duas colunas, X-Terra C18 e Zorbax C8, a fim de avaliar a capacidade de retenção dos compostos em ambas. Nas condições cromatográficas testadas, a coluna X-Terra C18 foi capaz de reter e separar satisfatoriamente os compostos de interesse, enquanto na coluna Zorbax C8 a clofazimina apresentou tempos de retenção demasiadamente longos.

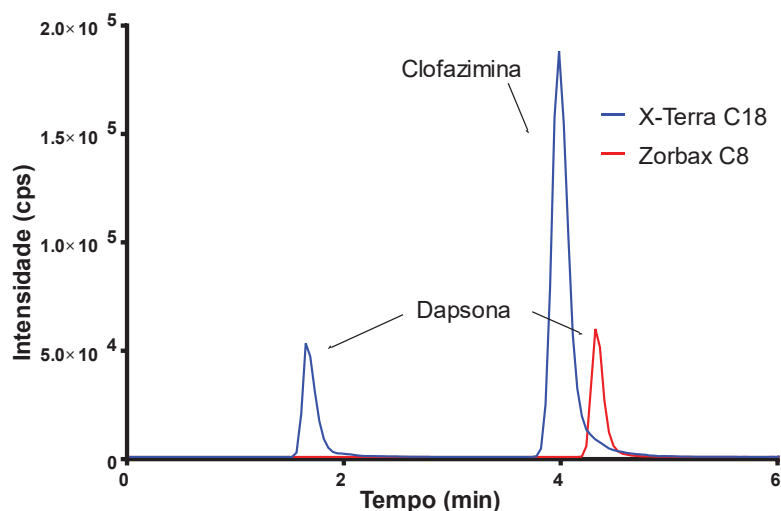
Sendo assim, a X-Terra C18 foi escolhida pois esta oferece a capacidade de realizar análises mais rápidas e em geral colunas C18 são de mais comum uso em laboratórios do que colunas C8. Um exemplo de cromatogramas obtidos para ambas as colunas está apresentado na Figura 10.

QUADRO 10 – MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA

Referência	Analito	Fase Estacionária	Fáse Móvel
TYAGI <i>et al.</i> , 2015	Clofazimine	Waters X-Terra C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 μ m)	Água:Acetonitrila:Ácido fórmico 50:50:0,1 (v/v/v)
KIM <i>et al.</i> , 2015	Clofazimine	Atlantis HILIC (2,1 x 150 mm, 3 μ m)	Água e Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, eluição gradiente.
LI <i>et al.</i> , 2018	Clofazimine	Waters XSelect CSH C18 (2,1 x 50 mm, 2,5 μ m)	Água e Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, eluição gradiente.
HADJIGEORGIOU <i>et al.</i> , 2009	Dapsone	Phenomenex Luna C18 (2 x 150 mm, 5 μ m)	Água com 1 mM de Formiato de amônio:Acetonitrila 80:20 (v/v)
KAKLAMANOS; THEODORIDIS, 2012	Dapsone	ThermoFisher Hypersil C18 (4,6 x 150 mm, 4 μ m)	Água contendo 1% de ácido acético e Metanol, eluição gradiente
BONDE <i>et al.</i> , 2013	Dapsone	Chromolith Hi-resolution C18 (4,6 x 100 mm)	Água com 2 mM de Acetato de amônio:Acetonitrila 90:10 (v/v)
LIU <i>et al.</i> , 2013	Dapsone	Waters Acquity UPLC BEH Hilic (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m)	Água:Acetonitrila:Ácido fórmico 15:85:0,1 (v/v/v)

Fonte: O autor, 2019

FIGURA 10 – CROMATOGRAMA COMPARATIVO X-TERRA C18 E ZORBAX C8



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1v/v); Fluxo: 400 μ L/min; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 μ L; Detecção: modo positivo.

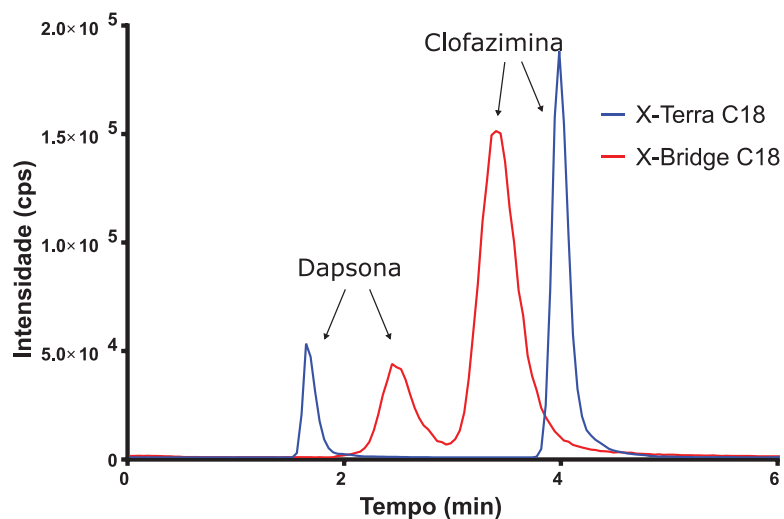
Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 μ g/mL

Fonte: O autor, 2019.

A fim de garantir a escolha da coluna ideal para o método foi realizada a comparação de duas colunas C18 distintas, X-Terra C18 e X-Bridge C18. Nas condições cromatográficas testadas ambas as colunas apresentaram resultados

semelhantes, porém foi escolhido a coluna X-Terra C18 pois esta apresentou picos com melhor simetria, mais afilados e com maior resolução. Um exemplo de cromatograma comparativo entre as duas colunas está apresentado na Figura 11.

FIGURA 11 – CROMATOGRAMA COMPARATIVO COLUNA X-TERRA C18 E X-BRIDGE C18



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1 v/v); Fluxo: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; Temperatura do forno: 40 $^{\circ}\text{C}$; Volume de injeção: 10 μL ; Detecção: modo positivo.

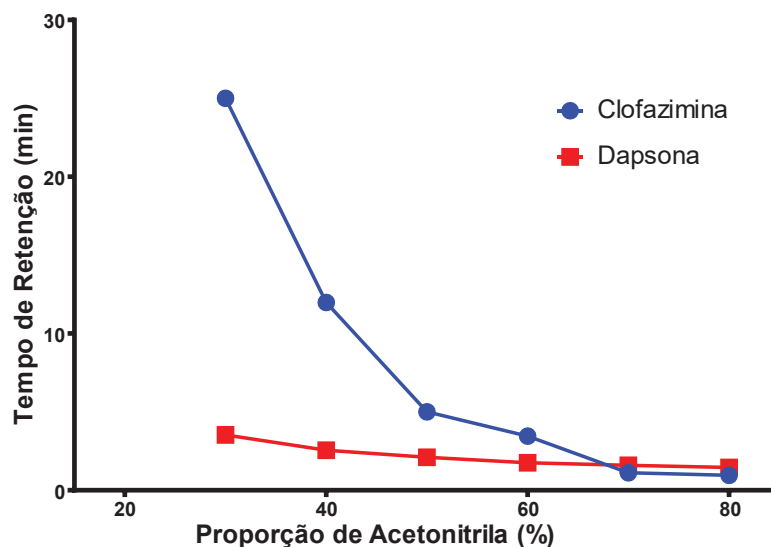
Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fonte: O autor, 2019.

Tendo sido realizada a escolha da coluna, o próximo passo foi a otimização da fase móvel a ser utilizada. Para isto foi avaliado a influência da fase orgânica no tempo de retenção dos compostos de interesse. Este estudo foi realizado utilizando-se misturas de água e acetonitrila em proporções de 30 a 80% (v/v) de fase orgânica, todas contendo 0,1% de ácido fórmico. Em todas as condições o modo de eluição foi isocrático com fluxo mantido em 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Conforme demonstrado no Gráfico 1, ambos os compostos apresentaram maior afinidade pela fase orgânica sendo mais rapidamente eluídos com o aumento de acetonitrila.

GRÁFICO 1 – TEMPO DE RETENÇÃO DA CLOFAZIMINA E DAPSONA EM RELAÇÃO A PROPORÇÃO DE ACETONITRILA NA FASE MOVEL



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico; Fluxo: 400 μ L/min; Coluna: XTerra® MS C18 3.5 μ m, 2,1 x 150 mm; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 μ L; Detecção: modo positivo
 Fonte: O autor, 2019.

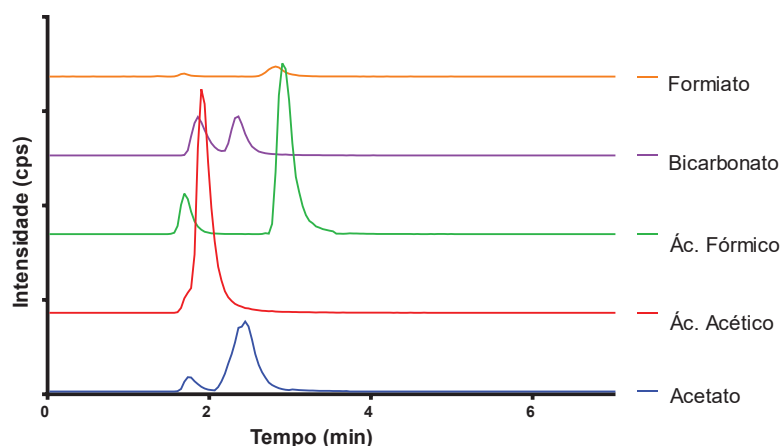
Independente da proporção utilizada para compor a fase móvel, os picos se mantiveram simétricos, porém, em proporções menores que 50% de acetonitrila a clofazimina apresentou tempos de retenção demasiadamente longos, chegando a 25 min com altas proporções de água. Em contrapartida, a dapsona apresentou tempos de retenção baixos em todas as proporções testadas.

Dentre as proporções testadas, a composição que garantiu a melhor cromatografia foi a de 60% de acetonitrila, pois além de apresentar uma boa simetria dos picos, foi capaz de separar satisfatoriamente os compostos em um tempo curto, oferecendo a possibilidade de um método rápido com um tempo de 5 min.

Em um segundo momento foi realizada a avaliação de diferentes aditivos na fase móvel, a fim de averiguar uma possível melhora do perfil cromatográfico. Foram testados ácido fórmico, ácido acético, ambos na concentração de 0,1%, acetato de amônio, bicarbonato de amônio e formiato de amônio, todos na concentração de 5 mM, com pH de 4,5, 7 e 3, respectivamente.

Não houve ganhos significativos no perfil cromatográfico dos analitos, sendo que no caso do formiato de amônio ocorreu supressão da ionização dos compostos e no caso do ácido acético, acetato e bicarbonato de amônio ocorreu perda da resolução entre os compostos, como demonstrado na Figura 12.

FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS NA FASE MÓVEL



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila (40:60 v/v); Fluxo: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; Coluna: XTerra[®] MS C18 3.5 μm , 2,1 x 150 mm; Temperatura do forno: 40 $^{\circ}\text{C}$; Volume de injeção: 10 μL ; Detecção: modo positivo.

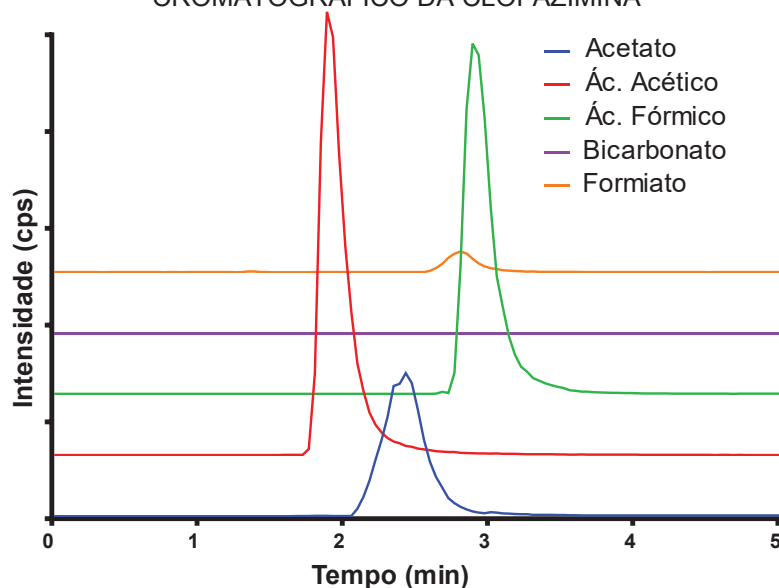
Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fonte: O autor, 2019.

Quando observado os cromatogramas individualmente para a clofazimina, demonstrados na Figura 13, nota-se o baixo impacto dos diferentes aditivos no tempo de retenção da clofazimina quando em pH ácido, porém observa-se um aumento significativo do tempo de retenção, superiores a 30 min, quando utilizado pH neutro (bicarbonato). Para a clofazimina, os aditivos que apresentaram melhor perfil cromatográfico, sem perda da intensidade do sinal foram o ácido fórmico e ácido acético em concentração de 0,1%.

Como observado na Figura 14, os aditivos impactaram pouco efeito no tempo de retenção da dapsona, em contrapartida o efeito dos mesmos na ionização da dapsona foi alto, reduzindo em até 10 vezes a intensidade do sinal (cps). Do mesmo modo que a clofazimina os aditivos que demonstraram melhor desempenho na eluição cromatográfica da dapsona foram os ácidos acético e fórmico na concentração de 0,1%.

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS DA FASE MÓVEL NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA CLOFAZIMINA

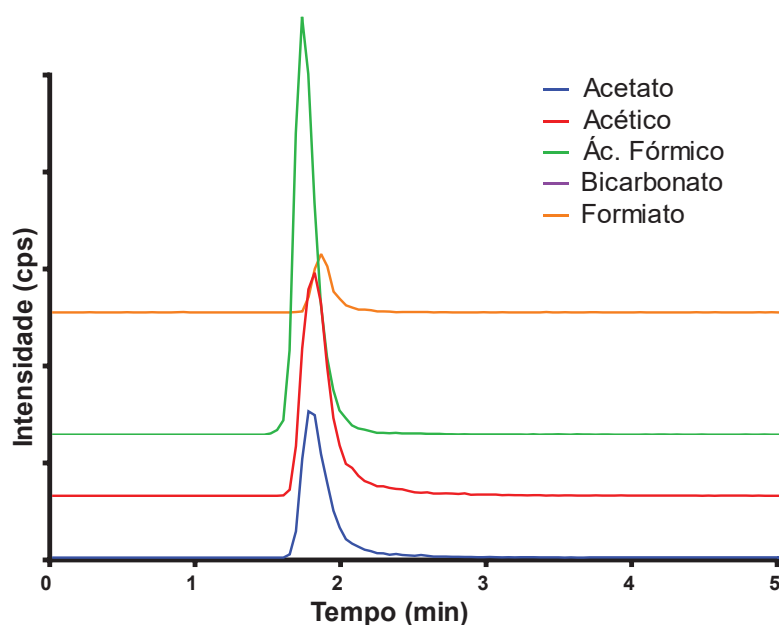


Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila (40:60 v/v); Fluxo: 400 μ L/min; Coluna: XTerra® MS C18 3.5 μ m, 2,1 x 150 mm; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 μ L; Detecção: modo positivo.

Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 μ g/mL

Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 14 – COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS DA FASE MÓVEL NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA DAPSONA



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila (40:60 v/v); Fluxo: 400 μ L/min; Coluna: XTerra® MS C18 3.5 μ m, 2,1 x 150 mm; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 μ L; Detecção: modo positivo

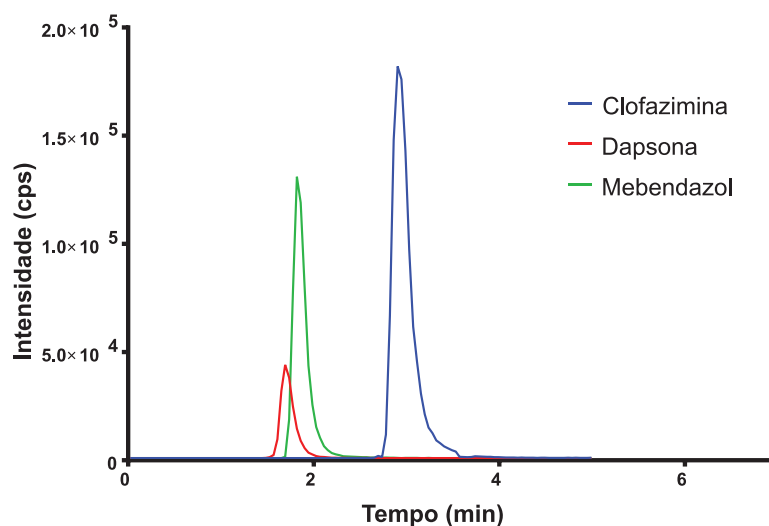
Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 μ g/mL

Fonte: O autor, 2019.

Diante desse contexto, o aditivo que demonstrou melhor desempenho foi o ácido fórmico a 0,1%, quando adicionado a água e acetonitrila na proporção de 40:60 (v/v).

Sendo assim as condições cromatográficas escolhidas foram a coluna XTerra® MS C18 3.5 μm , 2,1 x 150 mm, combinado com a fase móvel constituída por uma mistura de água e acetonitrila (40/60 (v/v)) acidificada com ácido fórmico 0,1%, eluída em modo isocrático, com fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. O sistema foi mantido a uma temperatura de 40 °C e o volume de injeção utilizado foi de 10 μL . O cromatograma final obtido com o método escolhido encontra-se apresentado na Figura 15.

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA FINAL OBTIDO COM O MÉTODO DESENVOLVIDO



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1 v/v); Fluxo: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$;
Coluna: XTerra® MS C18 3.5 μm , 2,1 x 150 mm; Temperatura do forno: 40 °C;
Volume de injeção: 10 μL ; Detecção: modo positivo.
Nota: Concentração dos analitos e PI: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fonte: O autor, 2019.

4.2 AVALIAÇÃO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Com base nos métodos previamente encontrados na literatura, apresentados no Quadro 11, optou-se por realizar a avaliação dos métodos de extração por precipitação de proteínas e líquido-líquido, devido a sua fácil aplicação, alta reprodutibilidade e baixo custo.

QUADRO 11 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA

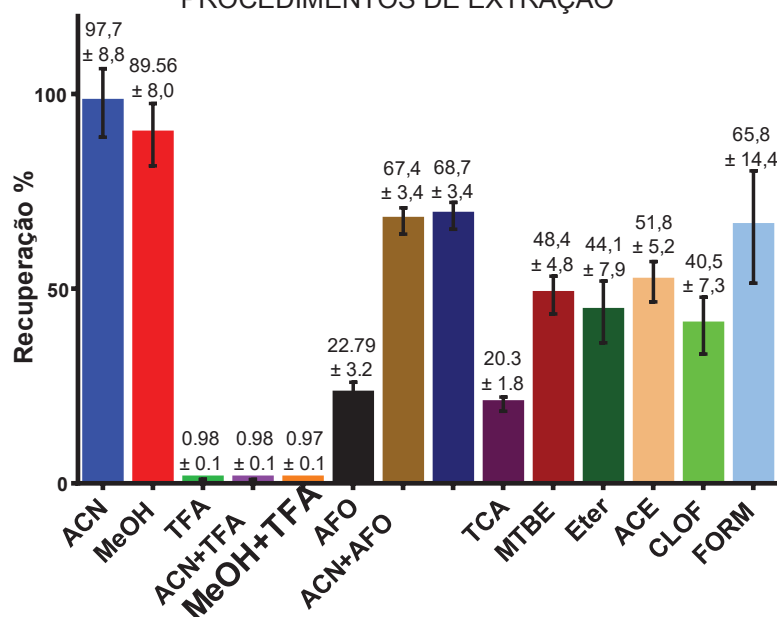
Referencia	Analito	Matriz	Extração	Solvente Extrator
TYAGI <i>et al.</i> , 2015	Clofazimina	Soro Humano e Tecidos	PPE ¹	Acetonitrila
KIM <i>et al.</i> , 2015	Clofazimina	Plasma Humano	PPE ¹	Metanol
LI <i>et al.</i> , 2018	Clofazimina	Manchas de Sangue Seco	-	Metanol
HADJIGEORGIOU <i>et al.</i> , 2009	Dapsona	Musculo e Leite	LL ² e SPE ³	Diclorometano
KAKLAMANOS; THEODORIDIS, 2012	Dapsona	Musculo e Leite	PPE ¹ e SPE ³	Acetonitrila
BONDE <i>et al.</i> , 2013	Dapsona	Plasma Humano	LL ²	Acetonitrila
LIU <i>et al.</i> , 2013	Dapsona	Plasma Rato	LL ²	Diclorometano

Dados: 1-PPE: Precipitação de Proteínas; 2-LL: Extração Líquido-Líquido; 3-SPE: Extração em Fase Sólida

Fonte: O autor, 2019.

A clofazimina possui uma extração altamente dependente do solvente utilizado, apresentando recuperações entre 1 a 97%. Este analito foi melhor extraído pelo método de precipitação de proteínas, exceto em meio ácido, atingindo recuperações de até 97% quando utilizado acetonitrila como solvente extrator, sendo este o solvente de escolha para este composto. A recuperação obtida para a clofazimina está apresentada no Gráfico 2.

GRÁFICO 2 – RECUPERAÇÃO CLOFAZIMINA OBTIDA EM PLASMA UTILIZANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

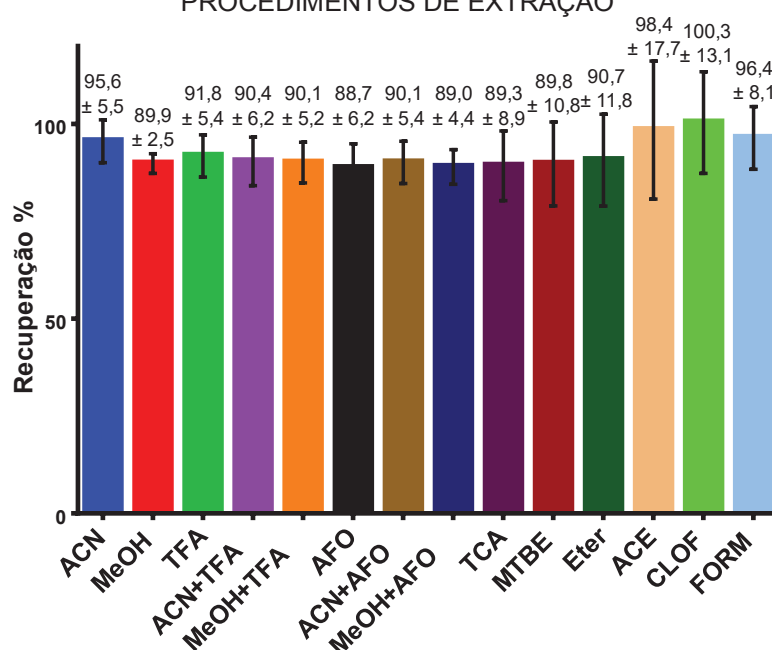


Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1 v/v); Fluxo: 400 µL/min; Coluna: XTerra® MS C18 2,1 x 150 mm, 3,5 µm; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 µL; Detecção: modo positivo

Fonte: O autor, 2019.

Em contraste com a clofazimina, a dapsona apresenta uma boa extração em todos os solventes testados, próximo a 90% para todos os solventes testados. Diante deste cenário, optou-se por utilizar como solvente extrator a acetonitrila, pelo método de precipitação de proteínas, pois além de oferecer a melhor extração para a clofazimina, foi capaz de extrair 95% de dapsona com uma boa reprodutibilidade (DPR% < 10%). Os resultados obtidos para a dapsona estão apresentados no Gráfico 3.

GRÁFICO 3 – RECUPERAÇÃO DAPSONA OBTIDA EM PLASMA UTILIZANDO DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO



Condições de análise: Fase móvel: água:acetonitrila:ácido fórmico (40:60:0,1 v/v); Fluxo: 400 µL/min; Coluna: XTerra® MS C18 2,1 x 150 mm, 3.5 µm; Temperatura do forno: 40 °C; Volume de injeção: 10 µL; Detecção: modo positivo

Fonte: O autor, 2019.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

4.3.1 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação do método foram determinados experimentalmente, sendo que a resposta dos analitos tiveram no mínimo 3 e 10 vezes o sinal do ruído respectivamente. O limite de detecção encontrado, com precisão desejável (DPR% < 15%) foi de 5 ng/mL para a clofazimina e de 50 ng/mL para a dapsona. A fim de reduzir o intervalo de quantificação e aprimorar a precisão e

exatidão do método (DPR% < 15% e EPR < 15%) foi escolhido como LSQ para a clofazimina e dapsona 50 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente, essa escolha é justificada pelo fato de que não é necessário concentrações tão baixa dos compostos com base nos níveis plasmáticos já reportados na literatura (BONDE *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; TYAGI *et al.*, 2015).

4.3.2 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada em amostras de plasma humano normal, lipêmico e hemolisado. As respostas dos picos interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos foram menores que 20% do sinal dos mesmos no CQ-LIQ. Enquanto os picos próximos ao tempo de retenção do padrão interno apresentaram sinais menores que 5% do sinal na concentração de PI utilizada. Deste modo, o método se mostrou seletivo para os compostos de interesse e PI nas concentrações analisadas. As áreas obtidas nas diferentes análises estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – ÁREAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA CLOFAZIMINA, DAPSONA E MEBENDAZOL EM PLASMA BRANCO NORMAL, LIPÊMICO E HEMOLISADO

Plasma Branco	n	% em relação a área CQ-LIQ		
		Clofazimina	Dapsona	Mebendazol
Normal	1	9,4	1,8	0,1
	2	4,3	1,3	0,1
	3	4,0	1,2	0,1
	4	8,3	0,8	0,1
	5	7,7	1,0	0,1
Lipêmico	1	16,7	0,4	0,1
	2	14,9	2,3	0,1
Hemolisado	1	8,9	1,3	0,1
	2	3,9	3,8	0,1

Fonte: O autor, 2019.

4.3.3 Curva de calibração

As curvas de calibração dos dois compostos foram preparadas de acordo com o item 3.10.3. O resumo dos resultados obtidos está apresentado nas Tabela 3 e 4

abaixo. Foi utilizado como limiar de aceitabilidade para os testes de hipótese um p-valor de 0,05.

TABELA 3 – RESUMO DAS AREAS OBTIDAS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA

Nível	Concentração	Média	DP	DPR
1	0,06	29767	3184	10,70
2	0,07	38500	3400	8,83
3	0,36	187667	21375	11,39
4	1,38	770000	88207	11,46
5	2,75	1512222	143665	9,50
6	3,44	1804444	98332	5,45
7	4,13	2135556	153269	7,18
8	5,50	2925222	283256	9,68

Nota: Número de replicatas por nível = 9

Fonte: O autor, 2019.

TABELA 4 – RESUMO DAS AREAS OBTIDAS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DAPSONA

Nível	Concentração	Média	DP	DPR
1	0,11	8346	1194	14,3
2	0,13	9809	1489	15,18
3	0,70	47489	3697	7,78
4	2,68	222556	15115	6,79
5	5,35	411000	34467	8,39
6	6,69	558111	72514	12,99
7	8,03	639444	59887	9,37
8	10,70	825333	73863	8,95

Nota: Número de replicatas por nível = 9

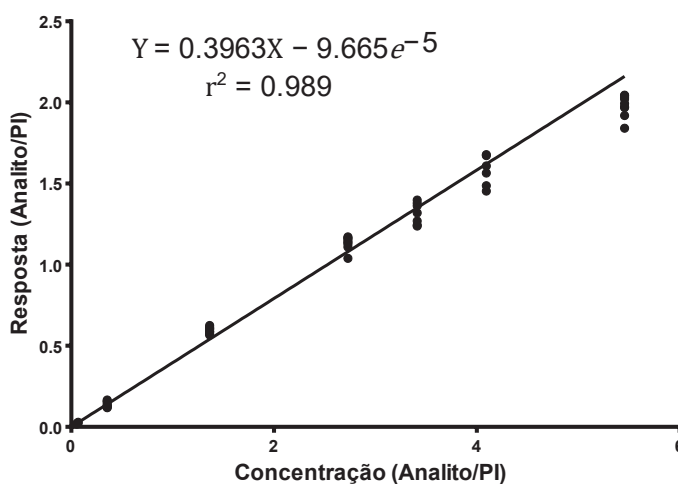
Fonte: O autor, 2019.

As curvas foram inicialmente geradas utilizando-se a técnica de regressão dos mínimos quadrados ordinários, porém as curvas de ambos os compostos se mostraram não ideais, com interceptos diferentes de zero. Utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk, onde foi obtido p-valores para a curva da clofazimina e dapsona de 0,0015 e 0,0008 rejeitando a hipótese nula, ou seja, a distribuição dos resíduos de ambas as retas se mostrou não-normais. Também ambas as equações de reta obtidas apresentaram um valor de intercepto estatisticamente diferente de zero. Ao se avaliar os interceptos das equações da reta obtidas através do Teste t, obteve-se p-valores de 0,0044 e 0,0240 para a clofazimina e dapsona respectivamente, rejeita-se assim a hipótese nula, ou seja, os valores dos interceptos não são iguais a zero.

Deste modo, é necessário a aplicação da técnica de regressão linear dos mínimos quadrados ponderado, a fim de realizar a normalização dos resíduos e da correção do intercepto. A aplicação da ponderação tem o intuito de melhorar a representação da realidade pelo modelo linear, a partir dos dados obtidos. Para a geração das equações foi utilizado o software IBM SPSS® v24 (EUA), e a ponderação capaz de representar os dados mais próximo a realidade foi escolhida através do teste de verossimilhança. Este teste avalia a probabilidade de um modelo corresponder à verdade populacional.

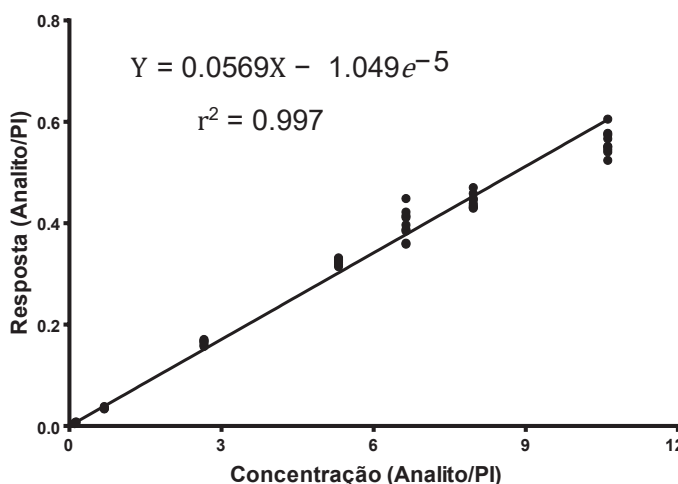
Para a clofazimina a ponderação que melhor atingiu os pré-requisitos acima foi a de $1/x^2$ e para a dapsona a ponderação de $1/x$. As curvas de calibração obtidas para a clofazimina e dapsona estão representadas na Figura 16 e 17 respectivamente.

FIGURA 16 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA



Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DAPSONA



Fonte: O autor, 2019.

A validação do modelo das retas foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA), sendo que ambas as curvas apresentaram resultados satisfatórios. Os resultados obtidos através da ANOVA estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, para a clofazimina e dapsona respectivamente.

TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS PELA ANOVA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Regressão	7,727	1	7,727	6399,182	0
Resíduo	0,085	70	0,001	-	-
Total	7,811	71	-	-	-

TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS PELA ANOVA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CLOFAZIMINA

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Regressão	0,899	1	0,899	10672,18	0
Resíduo	0,006	70	0,000		
Total	0,905	71			

O coeficiente de correlação de ambas as retas ($r > 0,99$) mostra que as variáveis testadas se relacionam proporcionalmente, enquanto o coeficiente de correlação de Pearson ($r^2 > 0,98$), mostra que existe uma alta correlação entre os níveis de concentração e as áreas. Os coeficientes obtidos e as demais informações da regressão encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 – INFORMAÇÕES DA REGRESSÃO LINEAR DA CLOFAZIMINA

	Valor	DP	t-valor	p-valor
Coefficiente linear	-9,665e-005	0,0005945	0,02643	0,8713
Coefficiente angular	0,3963	0,004954	6399	< 0,0001
r	0,995	-	-	-
r²	0,989	-	-	-

Fonte: O autor, 2019

TABELA 8 – INFORMAÇÕES DA REGRESSÃO LINEAR DA DAPSONA

	Valor	DP	t-valor	p-valor
Coefficiente linear	-1,049e-005	0,0007318	0,0002055	0,9886
Coefficiente angular	0,05693	0,0005510	10678	< 0,0001
r	0,997	-	-	-
r²	0,993	-	-	-

Fonte: O autor, 2019

4.3.4 Precisão e Exatidão

Através da avaliação das quintuplicatas das cinco concentrações controle de qualidade (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), durante três dias, foi possível verificar a exatidão e precisão do método. Para ambos os compostos o método demonstrou excelente precisão com DPR% entre 3 e 11%, abaixo do limite de 15% determinado pela legislação. Os valores de EPR% encontrados se mantiveram entre -10 e 10%, também dentro dos 15% de variação preconizado pela legislação.

Em virtude destes resultados pode-se afirmar que o método desenvolvido apresenta precisão e exatidão adequadas para a aplicação proposta. Os dados obtidos estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PELO MÉTODO BIOANALITICO DESENVOLVIDO PARA A CLOFAZIMINA

Nível		CQ-LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1° dia (n=5)	Média	0.06	0.07	2.88	3.70	2.47
	DPR%	5.71	6.68	1.84	3.80	6.27
	EPR%	6.31	4.52	4.58	-10.23	-10.29
2° dia (n=5)	Média	0.06	0.08	2.92	4.22	2.77
	DPR%	7.13	4.31	1.55	6.67	5.50
	EPR%	2.18	9.22	6.18	2.20	0.79
3° dia (n=5)	Média	0.06	0.07	2.81	4.08	2.83
	DPR%	4.43	2.91	7.01	5.28	3.14
	EPR%	9.78	4.74	2.07	-1.09	2.83
Interdia (n=15)	Média	0.0583	0.0730	2.8675	3.9996	2.6888
	DPR%	0.00	0.00	0.05	0.22	0.16
	EPR%	6.09	6.16	4.27	-3.04	-2.22

Fonte: O autor, 2019

TABELA 10 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PELO MÉTODO BIOANALÍTICO DESENVOLVIDO PARA A DAPSONA

Nível		CQ-LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1° dia (n=5)	Média	0.10	0.12	5.55	7.80	4.76
	DPR%	14.10	4.60	3.16	2.22	3.55
	EPR%	-10.96	-8.91	3.75	-2.82	-11.04
2° dia (n=5)	Média	0.11	0.12	5.63	7.98	5.46
	DPR%	4.57	1.47	2.64	7.77	6.92
	EPR%	-1.74	-9.54	5.26	-0.59	2.02
3° dia (n=5)	Média	0.09	0.14	5.62	8.93	5.81
	DPR%	5.62	3.58	3.70	0.91	3.21
	EPR%	-14.66	8.19	5.12	11.27	8.60
Interdia (n=15)	Média	0.0972	0.1292	5.6022	8.2353	5.3426
	DPR%	0.01	0.01	0.04	0.50	0.44
	EPR%	-9.12	-3.42	4.71	2.62	-0.14

Fonte: O autor, 2019

4.3.5 Recuperação

Os dados obtidos para a recuperação do método extrativo de escolhido estão apresentados na Tabela 11. Ambos os compostos apresentaram recuperação satisfatória, acima de 80%, com uma alta reprodutibilidade (DPR% <10%). Deste modo a extração por precipitação de proteínas com acetonitrila foi considerada uma técnica efetiva para a extração dos compostos em plasma.

TABELA 11 – VALORES DE RECUPERAÇÃO DA CLOFAZIMINA E DAPSONA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA

Analíto	Nível	DPR%	Recuperação
Clofazimina	CQB	7,34	91,83
	CQM	9,00	97,74
	CQA	5,34	95,17
Dapsona	CQB	5,74	98,19
	CQM	5,27	95,58
	CQA	6,55	98,96

Fonte: O autor, 2019

4.3.6 Efeito Matriz

Por meio da avaliação dos fatores de matriz normalizados obtidos em plasma normal, lipêmico e hemolisado, foi possível demonstrar que o método desenvolvido não apresenta efeito matriz. Visto que os valores de DPR% dos FMN foram inferiores a 15%. Os valores obtidos nos ensaios de efeito matriz encontram-se na Tabela 12 abaixo.

TABELA 12 – RESULTADOS EFEITO MATRIZ

Analito	Nível	Média FMN	DP	DPR%
Clofazimina	CQB	0,6461	0,0168	2,60
	CQA	0,7597	0,0202	2,66
Dapsona	CQB	0,9066	0,0157	1,74
	CQA	1,2132	0,0431	3,55

Fonte: O autor, 2019

4.3.7 Efeito Residual

Na avaliação do efeito residual nas injeções alternadas de plasma branco e CQA, as respostas de possíveis picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos e PI foram inferiores a 20% dos picos obtidos no nível do CQ-LIQ para os analitos e menor que 5% do sinal do PI. Deste modo, foi demonstrado que o método desenvolvido é isento de efeito residual para os analitos e para o PI. Os resultados obtidos e cromatogramas estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – RESULTADOS EFEITO RESIDUAL

Amostra	Proporção da Resposta (%)*		
	Clofazimina	Dapsona	Mebendazol
Pré-Injeção	7,9	1,1	0,1
Pós-Injeção 1	18,3	15,1	0,3
Pós-Injeção 2	5,5	1,3	0,1

*Em relação a resposta no nível CQ-LIQ

Fonte: O autor, 2019

4.3.8 Estabilidade

4.3.8.1 Estabilidade dos analitos em plasma

A avaliação da estabilidade demonstrou que os compostos são estáveis em plasma quando mantidos a 22 °C durante 6 h sobre a bancada, quando armazenados no gerenciador de amostras a 5 °C durante 8 h e quando submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os analitos também se mostraram estáveis quando mantidos a -40 °C durante 30 dias. Os valores de DPR% e DPR% estão apresentados na Tabela 14 abaixo.

TABELA 14 – RESULTADOS ESTABILIDADE EM PLASMA

Analito	Nível	Curta		Pós-Processamento		Longa		Ciclos	
		DPR%	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%	EPR%
Clofazimina	CQB	3.7	12.7	3.7	3.2	3.4	1.3	3.6	3.1
	CQA	4.2	-10.0	3.4	-2.9	3.8	-1.2	4.7	-3.8
Dapsona	CQB	3.3	-3.6	4.6	5.6	4.3	9.6	4.2	6.9
	CQA	2.1	15.0	4.8	-3.3	3.1	-3.6	3.0	-1.9

Fonte: O autor, 2019.

4.3.8.2 Estabilidade dos analitos em solução

Os analitos de mostraram estáveis em solução quando mantidos a 6 h sob temperatura de 22 °C, 72 h em geladeira (4 °C) e armazenados durante 30 dias a -40 °C. Os resultados obtidos para DPR% e EPR% estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 – RESULTADOS ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO

Analito	Nível	6h		72h		30 dias	
		DPR%	EPR%	DPR%	EPR%	DPR%	EPR%
Clofazimina	CQB	3.4	-2.1	3.5	-4.4	3.3	-9.5
	CQA	3.8	4.5	4.6	-3.0	3.8	-7.5
Dapsona	CQB	3.4	-2.6	3.4	7.9	4.6	10.6
	CQA	4.7	6.3	4.4	0.6	9.1	-2.2

Fonte: O autor, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método para quantificação de clofazimina e dapsona por CLAE-EM/EM desenvolvido e validado neste trabalho, se mostrou adequado para o fim proposto, sendo capaz de quantificar simultaneamente os dois fármacos propostos, de maneira eficiente e rápida.

Entre os métodos de extração testados a precipitação de proteínas com acetonitrila proporcionou uma recuperação satisfatória e reprodutível para os compostos de interesse.

Os parâmetros de validação avaliados demonstraram que o método é sensível, seletivo, linear, preciso exato e isento de efeito residual e matriz. Os analitos se mostraram estáveis em todas as condições testadas tanto em matriz quanto em solução.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. et al. Epidemiological significance of first skin lesion in leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 66, n. 2, p. 131–139, 1998.
- ARAÚJO OPROMOLLA, P.; CARLOS, A.; MARTELLI, C. Terminology related to hansen's disease. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 293–294, 2005. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE00ID.htm>>.
- ARAÚJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 1412–1420, 23 ago. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>>.
- BABALIK, A. et al. Therapeutic drug monitoring in the treatment of active tuberculosis. **Canadian respiratory journal**, v. 18, n. 4, p. 225–229, 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/PMC3205104>>.
- BAIK, J. et al. Multiscale Distribution and Bioaccumulation Analysis of Clofazimine Reveals a Massive Immune System-Mediated Xenobiotic Sequestration Response. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1218–1230, mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263006>>.
- BAIK, J.; ROSANIA, G. R. Macrophages Sequester Clofazimine in an Intracellular Liquid Crystal-Like Supramolecular Organization. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047494>>.
- BELDARRAÍN-CHAPLE, E. Historical Overview of Leprosy Control in Cuba. **MEDICC Review**, v. 19, n. 1, p. 23–30, 2017. Disponível em: <<http://www.medicc.org/mediccreview/index.php?issue=42&id=575&a=va>>.
- BELTRÁN-ALZATE, C. et al. Leprosy Drug Resistance Surveillance in Colombia: The Experience of a Sentinel Country. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, 5 out. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005041>>.
- BONDE, S. L. et al. Simultaneous determination of dapsone and its major metabolite N-Acetyl Dapsone by LC-MS/MS method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. SUPPL 3, p. 441–446, 2013.
- BRASIL. **Guia para o Controle da Hanseníase**. [s.l.: s.n.]
- BRASIL. Plano nacional de eliminação da Hanseníase em nível municipal: 2006-2010. **Ministério da Saúde do Brasil**, 2006. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi->

bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p
&nextAction=lnk&exprSearch=468744&indexSearch=ID>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BRASIL. Resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, 2012.

BRASIL. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das heohelmintíase: Plano de ação 2011-2015**. [s.l.: s.n.]

BRASIL. Guia prático sobre a Hanseníase. **Ministério da Saúde do Brasil**, p. 68, 2017.

BRASIL. Boletim epidemiológico – 20/06/2018. **Ministério da Saúde do Brasil**, v. 50, p. 1–15, 2018.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, p. 1209–1219, 10 abr. 2004. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673604159527?via%3Dihub>
>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 4, p. 317–323, 1 abr. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00704.x>>.

CETOLIN, S. F. et al. Hanseníase e cidadania na política de saúde brasileira. **Sociedade em debate**, v. 16, n. 2, p. 135–162, 2010. Disponível em:
<<http://revistas.ucpel.tche.br/index.php/rsd/article/view/677>>.

CHAVES, L. L. et al. Overcoming Clofazimine Intrinsic Toxicity: Statistical Modelling and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 15, fev. 2018. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29436513>>.

CHOLO, M. C. et al. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 290–298, 20 out. 2011. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1093/jac/dkr444>>.

CHOLO, M. C. et al. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 2, p. 338–353, 2016. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1093/jac/dkw426>>.

CLARO, L. B. L. **Hanseníase: representações sobre a doença**. [s.l.] Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 1995.

CRUZ, R. C. S. da et al. Leprosy: Current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 6, p. 761–773, 2017.

CUNHA, V. da S. **O isolamento compulsório em questão: políticas de combate à lepra no Brasil (1920-1941)**. 2005. 2005. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4004>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 7, p. 554–563, 1 set. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1578219013001431>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

FARIA, L.; CALÁBRIA, L. K. Aspectos históricos e epidemiológicos da hanseníase em Minas Gerais. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 6, n. 3, p. 406–424, 2017.

FRANCO-PAREDES, C.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Unsolved matters in leprosy: a descriptive review and call for further research. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 33, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12941-016-0149-x>>.

GASCHIGNARD, J. et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, p. 1–20, 24 maio 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27219008>>.

GENOVEZ, P. F.; PEREIRA, F. R. Da Lepra À Hanseníase: Política Pública, O Cotidiano E O Estigma a Partir Da Memória De Seus Atores – Governador Valadares (Década De 1980). **História: Questões & Debates**, v. 60, p. 205–228, 2014.

GOULART, I. M. B. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, p. 101–105, 2008.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, p. 269–290, jul. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y>>.

GREBOGI, I. H. **Obtenção e Caracterização De Complexos Binários e Ternários de Dapsona**. 2009. 2009.

GURAGAIN, S.; UPADHAYAY, N.; BHATTARAI, B. M. Adverse Reactions in Leprosy Patients Who Underwent Dapsone Multidrug Therapy: A Retrospective Study. **Clinical pharmacology : advances and applications**, v. 9, p. 73–78, 29 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28721106>>.

HADJIGEORGIOU, M. et al. Determination of dapsone in meat and milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1–2, p. 220–224, 1 abr. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009000105?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

HULSE, E. V. Leprosy and Ancient Egypt. **The Lancet**, p. 1024–1025, 11 nov. 1972. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673672924336?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

JIN, S.-H.; AHN, K. J.; AN, S. Importance of the immune response to Mycobacterium leprae in the skin. **Biomedical Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 1–6, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s41702-017-0012-5>>.

KAKLAMANOS, G.; THEODORIDIS, G. Determination of Dapsone in Muscle Tissue and Milk Using High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 29–35, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf203701f>>.

KAR, H. K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, p. 55–65, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X14001497>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KIM, H.-J. et al. Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 9–16, 5 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514004105?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: review of epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.

LI, W. et al. Quantitative analysis of clofazimine (Lamprene®), an antileprosy agent, in human dried blood spots using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 2, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.4068>>.

LIU, Y. et al. UPLC–MS-MS Method for Simultaneous Determination of Caffeine, Tolbutamide, Metoprolol, and Dapsone in Rat Plasma and its Application to

Cytochrome P450 Activity Study in Rats. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 26–32, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bms100>>.

MACIEL, R. M. T. A Lepra no Oriente e Ocidente: da Antiguidade à Idade Média. **Revista Mosaico**, v. 11, p. 131–143, 21 ago. 2018. Disponível em: <<http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/mosaico/article/view/6388>>.

MARIOTTI, V. et al. Probable early presence of leprosy in Europe in a Celtic skeleton of the 4th–3rd century BC (Casalecchio di Reno, Bologna, Italy). **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 15, p. 311–325, 1 set. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/oa.775>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Leprologia**. [s.l: s.n.]

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública 2016**. [s.l: s.n.]

MOET, F. J. et al. Physical Distance, Genetic Relationship, Age, and Leprosy Classification Are Independent Risk Factors for Leprosy in Contacts of Patients with Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 346–353, 1 fev. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/499278>>.

MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, p. 1040–1042, 13 maio 2005. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/308/5724/1040.abstract>>.

MONTEIRO, L. M. et al. Development and Characterization of a New Oral Dapsone Nanoemulsion System: Permeability and in Silico Bioavailability Studies. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 5175–5182, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055729>>.

MS. DECRETO Nº 968, de 7 de maio de 1962 -. 1962.

NAAZ, F. et al. **Challenges beyond elimination in leprosy** **International Journal of Mycobacteriology**, 2017. . Disponível em: <[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L617718499%0Ahttp://dx.doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_70_17%0Ahttp://vu.on.worldcat.org/atoztitles/link?sid=EMBASE&issn=2212554X&id=doi:10.4103%2Fijmy.ijmy_70_17&a title=Challenges+beyond+](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L617718499%0Ahttp://dx.doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_70_17%0Ahttp://vu.on.worldcat.org/atoztitles/link?sid=EMBASE&issn=2212554X&id=doi:10.4103%2Fijmy.ijmy_70_17&a title=Challenges+beyond+>)>.

OLIVEIRA, F. R. et al. Clinical applications and methemoglobinemia induced by dapsone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1770–1779, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532014001000003&nrm=iso>.

PAI, V. **Role of clofazimine in management of reactions in leprosy: A brief overview** **Indian Journal of Drugs in Dermatology**, 2015. . Disponível em:

<<http://www.ijdd.in/article.asp?issn=2455-3972;year=2015;volume=1;issue=1;spage=12;epage=15;aulast=Pai>>.

PRASAD, P. S. et al. **MDT-MB therapy in paucibacillary leprosy: A clinicopathological assessment** *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 2009. .

RIBEIRO, M. D. A.; SILVA, J. C. A.; OLIVEIRA, S. B. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação Artigo original Como citar. **Rev Panam Salud Publica**, v. 42, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.42>>.

ROBBINS, G. et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). **PLOS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5669, 27 maio 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005669>>.

RODRIGUES JÚNIOR, I. A. et al. Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 118–122, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971216000382>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SANTOS, K. da S. et al. Significado da hanseníase para pessoas que viveram o tratamento no período sulfônico e da poliquimioterapia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 4, p. 620–627, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0104-1169.0323.2596 PP> - Ribeirão Preto>.

SAPRIADI, S.; WANCI, R.; SYAHRIDHA. The correlation between contact history and knowledge with incidence of leprosy in Jeneponto district, South Sulawesi, Indonesia. **International Journal Of Community Medicine And Public Health; Vol 6, No 1 (2019): January 2019** DO - 10.18203/2394-6040.ijcmph20185232, v. 6, n. 1, p. 89–92, 24 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.ijcmph.com/index.php/ijcmph/article/view/3878>>.

SCHNEIDER, D. S.; WADI, Y. M. **Lepra: representações da doença e dos doentes através de discursos médico-científicos e governamentais**. [s.l: s.n.]

SCHUENEMANN, V. J. et al. Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 341, p. 179–183, 12 jul. 2013. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/341/6142/179.abstract>>.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, abr. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614253>>.

SCOLLARD, D. M. Infection with *Mycobacterium Lepromatosis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 3, p. 500–501, set. 2016.

SEKAGGYA-WILTSHIRE, C. et al. Delayed Sputum Culture Conversion in Tuberculosis–Human Immunodeficiency Virus–Coinfected Patients With Low Isoniazid and Rifampicin Concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 5, p. 708–716, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/cid/ciy179>>.

SHAH, V. P. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation : Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. v. 9, n. 1, 2007.

SOUSA, G. S. de; SILVA, R. L. F. da; XAVIER, M. B. Hanseníase e Atenção Primária à Saúde: uma avaliação de estrutura do programa. **Saúde em Debate**, v. 41, n. 112, p. 230–242, 2017.

SOUZA, E. A. de et al. **Leprosy and gender in Brazil: trends in an endemic area of the Northeast region, 2001_2014** *Revista de Saúde Pública* scielo, , 2018. .

STURKENBOOM, M. G. G. et al. Pharmacokinetic Modeling and Optimal Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of Rifampin in Patients with Tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4907–4913, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/59/8/4907.abstract>>.

TYAGI, S. et al. Clofazimine shortens the duration of the first-line treatment regimen for experimental chemotherapy of tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 3, p. 869–874, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1416951112>>.

USP. <1225> Validation of compendial procedures. **Usp34-Nf29**, n. c, p. 778–782, 2011. Disponível em: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225_1SUSP40.pdf%0Aw>.

WHO. **Chemotherapy of leprosy. Report of a WHO Study Group.** *World Health Organization - Technical Report Series*, 1994. .

WHO. Global Leprosy Situation 2012. n. 34, p. 317–328, 2012.

WHO. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. **Weekly Epidemiological Record**, v. 93, n. 35, p. 445–456, 2018.

WILLIAMS, D. L. et al. **Drug-resistant leprosy: Monitoring and current status.** [s.l: s.n.].v. 58

ZHU, Y. I.; STILLER, M. J. Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 3, p. 420–434, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962201229016>>.