1
Introdução

A espécie humana utiliza não apenas das respostas reflexas de autoproteção, comum aos animais, mas também de formas elaboradas de preservação e restauração da saúde. O emprego de medidas preventivas e curativas por meio da ingestão de substâncias está descrito em toda a história da humanidade [1]. Por toda a história, a ingestão de substâncias também tem sido feita com o intuito de alterar a percepção sensorial, em rituais religiosos ou na preparação para batalhas, e como forma de divertimento (lícito ou ilícito), tendo como exemplos clássicos desse uso lícito de drogas o consumo do éter etílico e da cocaína pela alta sociedade européia do século XIX. Outro exemplo relevante é o uso de agentes visando o aumento de desempenho atlético em competições esportivas, citadas desde os Jogos Olímpicos da antiguidade.

No ocidente, o uso terapêutico de drogas iniciou-se de maneira mais adequada durante o século IV, com a escola grega de Hipócrates, que publicou mais de 70 documentos sobre teoria médica e prática, e descreveu mais de 300 remédios, a maioria de origem vegetal. Os gregos já sabiam do potencial tóxico do uso da terapia com drogas, tanto que a palavra grega φαρμακον (pharmakon) significa droga medicinal, poção mágica ou veneno[2].

No seu sentido amplo, a palavra fármaco pode ser definida como qualquer agente químico que afeta os processos da vida, mas no seu sentido mais usual é definida como a substância útil na prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças humanas.[3] O desenvolvimento da indústria farmacêutica, aliado ao sucesso da farmacologia, da farmácia e da química/bioquímica constitui o mais extraordinário sucesso em termos de melhoria do modo de vida do homem, devido à obtenção de novos medicamentos e sua produção em massa pode-se considerar que a descoberta de novos medicamentos supera as demais descobertas que revolucionaram o bem-estar cotidiano do ser humano por não se limitar à medida insensível de custo e benefício. Quando a questão diz respeito a dor e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

sofrimento, a melhoria da qualidade ou prolongamento da vida são atributos imensuráveis materialmente [4].

Instituições de saúde particulares e privados gastam muitos recursos com medicamentos devido o seu papel em salvar vidas, melhorar a saúde, prevenir doenças e impedir epidemias. Para tal, as drogas devem ser seguras, efetivas e de boa qualidade, além de administradas adequadamente. Isto significa que a sua produção, importação, exportação e subsequente distribuição deve ser regulada para garantir sua ação segura [5]. Um exemplo mais recente de preocupação com o controle de medicamentos foi a ação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que fez controle efetivo dos remédios genéricos importados ou produzidos no país e intensificou a fiscalização para identificar medicamentos falsificados no comércio.

A preocupação com o nível de concentração de princípios ativos provenientes dos fármacos e de seus metabólitos em fluidos biológicos e tecidos é também relevante quando se leva em consideração que o nível de introdução medicamentosa deve ser compatível com o metabolismo do paciente. Esse monitoramento é fundamental para que riscos de superdosagem e suas consequências tóxicas (principalmente com fármacos de baixo índice terapêutico) sejam minimizados em pessoas que tenham seu metabolismo de passagem prejudicados por causa de disfunções hepáticas e renais. Além disso, o monitoramento de algumas substâncias específicas são de grande importância em análises clínicas. Essas metodologias podem proporcionar rápida avaliação das funções orgânicas (gastrointestinais, hormonais, renais, etc) agilizando o diagnóstico de pacientes e por consequência, poupando tempo e minimizando custos relativos à saúde pública.

Seguindo essa mesma linha, o monitoramento de substâncias ilícitas, tais como os entorpecentes e as substâncias usadas para o aumento de desempenho de atletas (“dopping”), é importante do ponto de vista forense e legal. De acordo com a comissão médica do Comitê Olímpico Internacional (COI), do qual o Comitê Olímpico Brasileiro (COB) é membro, cinco principais categorias de substâncias são utilizadas para “dopping”: estimulantes, narcóticos, esteróides anabolizantes, bloqueadores ß e diuréticos[6]. A identificação qualitativa destas substâncias ou metabólitos, usualmente em amostras de urina, é necessária para o controle efetivo do uso ilícito dessas drogas. A identificação de uma droga ou

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

metabólito em uma amostra deve ser, em geral, confirmada por dois métodos analíticos, um padrão (aprovado pelo controle de "dopping") e um alternativo [6].

Um dos grandes desafios da química analítica tem sido a demanda por métodos analíticos para a quantificação de compostos biologicamente importantes em fluidos biológicos. As concentrações dos produtos provenientes da degradação e impurezas de formulações farmacêuticas e a concentração de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos variam muito e a análise dos mesmos usualmente requer procedimentos de separação física e química previamente à determinação. A necessidade de métodos de separação de alta resolução é especialmente necessária no caso de análise de drogas que possuam similaridades estruturais com as substâncias concomitantes (interferentes). Análises deste tipo são caras devido ao custo da instrumentação e da demanda do requerido trabalho para serem realizadas. Os métodos padrões atualmente usados, tanto para as análises clínicas em geral e no monitoramento de substâncias ilícitas, são baseados nas técnicas cromatográficas gasosa, acoplada ou não a um espectrômetro de massas, e líquida, com diversos detectores (fluorescência fotométrico e detector na região do infravermelho com uso de transformada Fourier (HPLC-FTIR).

Existe sempre uma demanda para o desenvolvimento de métodos analíticos para substâncias específicas que não somente sejam sensíveis e seletivos, mas também tenham procedimento experimental simples. Isso é fato relevante principalmente se o método em questão resolve um problema analítico específico sem a necessidade do uso de etapas de separação off-line ou on-line, diminuindo os custos e o tempo de análise.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

1.1
O ciclofenil e seu uso como substância de aumento ilícito do desempenho atlético

O controle antidoping foi implantado pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) no ano de 1968, de lá para cá a lista de substâncias proibidas vem crescendo paulatinamente, impulsionada tanto a um avanço nas técnicas de síntese de medicamentos, quanto pelas técnicas analíticas utilizadas para coibir o uso de dopping. As técnicas analíticas devem se desenvolver para possibilitar a detecção de novas substâncias e coibir o uso de doping, impedindo que este possa ocorrer sem que haja a possibilidade de detecção, como aconteceu recentemente com o escândalo da tetrahidrogestrinona (THG). O THG, que é um esteróide que foi recentemente modificado por químicos, tornando-o indetectável nos exames antidoping, foi utilizado por competidores norte-americanos durante a última olimpíada [7] .

A WADA (world anti-doping agency) é o órgão responsável por publicar anualmente uma listagem de substâncias de uso proibido para atletas. Essa lista é adotada por várias confederações esportivas, entre elas o COI. Nesta publicação [8] consta o ciclofenil (Figura 1).

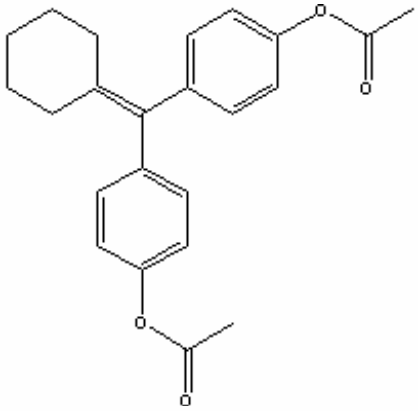

Figura 1 - Ciclofenil

O ciclofenil, (Bis(p-acetoxifenil)cicloexilidenometano) é um composto com propriedades estrogênicas usado como estimulante para o funcionamento dos ovários [9] [10] [11], e para o tratamento da síndrome climatérica [12]. A síndrome climatérica constitui no conjunto de sintomas que se manifestam na mulher durante o período que corresponde à passagem do ciclo reprodutivo para o ciclo não reprodutivo.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

Além disso, esta droga tem sido aplicada no tratamento da esclerodermia [13] [14] [15], uma doença relativamente nova, caracterizada pelo endurecimento da pele. A esclerodermia não tem causas aparentes, embora, segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, pode estar associada à exposição de produtos químicos ou a toxinas, ou mesmo como uma complicação do transplante da medula óssea.

Além destas aplicações medicinais, o ciclofenil também é utilizado por atletas do sexo masculino que objetivam um ganho em massa corporal. Como este composto é um estrogênio fraco, ele atua no organismo como um antiestrogênio, ocupando os sítios de receptores específicos, impedindo que estrogênios mais fortes se conectem a ele, tornando-se assim ativos. Isto causa um aumento da quantidade de testosterona no organismo e um ganho em força, massa muscular e energia. Em mulheres, o ciclofenil não possui este efeito, tanto que sua utilização é proibida pelo COI apenas para atletas do sexo masculino [8]. Pouco se sabe sobre a rota metabólica do ciclofenil no organismo.

Existem poucas publicações que relatam métodos para a determinação do ciclofenil, Crucs [16] (1972) descreve um trabalho para a determinação do composto após extração de tecidos (no caso foi usado músculo de boi). Após extração o material foi submetido a um procedimento de limpeza e o analito determinado por cromatografia gasosa com ionização por chama. Myung[17] (2002) também usando técnicas cromatográficas apresentou um trabalho sobre a caracterização de um metabólito do ciclofenil para detecção em urina usando cromatografia gasosa com espectrometria de massas de impacto eletrônico (GC-EI-MS) e cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massas em atmosfera quimicamente ionizada (HPLC/APCI-MS/MS). Apesar destes métodos serem seletivos o suficiente a ponto de ser aplicado a determinação em músculo bovino e urina, estes procedimentos cromatográficos envolvem complicados procedimentos de extração do analito e utilizam equipamentos caros e complexos. A sensibilidade dos métodos acima não é relatada.

No caso da determinação do ciclofenil em formulações farmacêuticas, existe apenas um trabalho publicado [18] usando espectrofotometria UV-Vis. Neste trabalho o produto gerado da degradação ácida do ciclofenil é determinado por ser mais estável em solução aquosa. As medidas quantitativas, usando varredura em 2ª derivada, foram feitas em 272 nm com recuperação de 101,1 $\pm$ 0,8%. Limite de detecção do método não foi relatado.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

1.2
A primaquina e seu uso como antimalárico

Malária humana, uma doença parasitária que tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Plasmodium*, é transmitido ao homem pela picada de um mosquito do gênero *Anopheles* [19] , embora a transfusão sanguínea (de sangue infectado) também seja um potencial fonte de transmissão da doença, a picada do mosquito é a forma mais comum. Esta doença infecta de 300 a 500 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável pela morte de 1 a 2 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade [20]. No Brasil esta é a principal doença endêmica, sendo que a grande maioria dos casos (99%) ocorre na região amazônica, com registro de 500 mil casos/ano, podendo surgir casos em outras regiões de matas onde vive o vetor da malária.

O desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 ocorrido graças aos projetos de colonização e expansão das fronteiras agrícolas, construção de estradas e hidrelétricas, projeto agropecuários, extração de madeira e mineração acelerou o processo migratório para esta região. Porém as precárias condições socioeconômicas da população migrante determinou a expansão da doença.

Dos casos de malária, cerca de 75% são devidos ao *Plasmodium vivax*, responsável por malária de gravidade menor. Menos de 1% dos casos de malária evolui para morte, e estes casos são causados pelo *Plasmodium* falciparum.

A Primaquina (Figura 2) ou 6-metoxi-8-(4-amino-l-metil-butilamina)quinolina é uma 8-aminoquinolina comumente utilizada no combate ao *Plasmodium vivax*, sua utilidade, no entanto é comprometida por seu efeito tóxico aos eritócitos, não podendo ser prescrita para gestantes e crianças menores de 6 meses. Sua toxicologia está relacionada com a oxidação da NADPH, produzindo um complexo específico entre a droga e seu cofator, facilitando assim a transferência de elétrons para o oxigênio, gerando radicais livres de oxigênio [21] que podem oxidar os eritócitos. O uso da primaquina e sua distribuição pelos órgãos de saúde são, por esse motivo, estritamente controlados.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

Seu modo de ação contra a malária reside em sua ação oxidativa sobre as formas assexuadas do parasitas que causam malária, localizados nas células vermelhas do sangue humano [22].

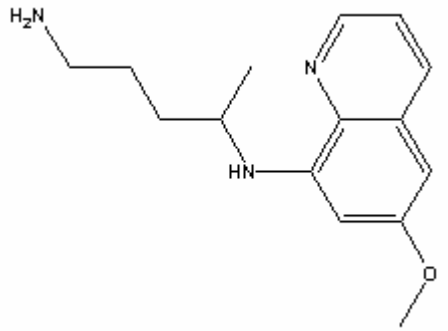

Figura 2 – Primaquina

A capacidade da primaquina em formar complexos metálicos é de interesse farmacológico, principalmente no que diz respeito a doenças causadas pela deficiência de íons metálicos e no entendimento de mecanismos de reações metabólicas. Estas informações são úteis no entendimento das ações terapêuticas e tóxicas desta droga.

Devido a sua importância terapêutica, muitos métodos foram desenvolvidos e publicados na literatura sobre a sua determinação em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos.

Possivelmente o primeiro método desenvolvido para a sua determinação tenha sido o método volumétrico descrito na "British Pharmacopeia 1973" [23] . Este método é baseado na diazotização do analito e é aplicável apenas a macroquantidades e não é muito seletivo.

Jamaluddin [24] (1984) propôs um método volumétrico para determinação da primaquina na forma pura e em formulações farmacêuticas. Este método baseia-se na formação de um complexo entre a primaquina e o vanádio em meio ácido, a titulação é feita com solução de Fe (II), usando como indicador ácido N-fenillantranilico.

Como a primaquina possui um conhecido poder quelante, a partir do inicio da década de 80 começaram a surgir muitos métodos espectrofotométricos baseados na absorção molecular na região do UV-Vis de complexos coloridos da primaquina. Como exemplos, têm-se o trabalho proposto por Ouf e colaboradores

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

[25] (1980) no qual são apresentados dois métodos colorimétricos para determinação da primaquina em formulações farmacêuticas. Estes métodos baseiam-se na reação da primaquina com a 2,6-Dicloroquinona cloramida (λ_{max} = 700 nm) e com a 1,2-Naphtaquinona-*4*-sulfonato (λ_{max} = 478 nm), ambos os métodos foram descritos como precisos pelo autor e satisfatórios para a determinação da primaquina, apesar de possuírem uma faixa linear dinâmica (FLD) curta (0,4 a 2,1 x 10^{-5} mol L^{-1} e 2,1 a 22,0 x 10^{-5} mol L^{-1} respectivamente). Limites de detecção não são indicados, mas a sensibilidade dos métodos pode ser avaliada pelo valor mínimo das FLD´s (0,4 e 2,1 x 10^{-5} mol L^{-1} respectivamente).

Hassan [26] (1982) desenvolveu outro método espectrofotométrico para se fazer à determinação da primaquina em formulações farmacêuticas. Para tal, fez uso de complexos estáveis formados entre a primaquina e o tiocianato de cobalto (λ_{max} = 625 nm), além disto, pode-se usar a quantidade de cobalto complexada para se determinar indiretamente a primaquina por espectrometria de absorção atômica, este é o primeiro trabalho propondo a determinação indireta de primaquina usando espectrometria de absorção atômica (AAS).

Ambos os métodos necessitam uma etapa de extração da solução aquosa da formulação farmacêutica para uma fase orgânica (nitrobenzeno), esta fase orgânica é centrifugada, clarificada e filtrada antes de ser analisada. O limites de detecção dos métodos não foram citados, apenas a faixa linear dinâmica utilizada pelo autor (2,2 a 17,6 x 10^{-4} mol L^{-1}). Como o autor constata uma sensibilidade melhor com o método baseado na absorção atômica (cinco vezes maior que a sensibilidade na absorção molecular) ele sugere que esse método seja aplicável a fluídos biológicos, embora ele não tenha realizado tais testes.

Sulaiman[27] (1985) propôs outro método espectrofotométrico para determinação da primaquina. Neste método, a primaquina é reagida com cloranil em pH 9, formando um complexo estável e colorido que absorve na região do ultravioleta (λ_{Max} = 305 nm). O autor não forneceu as figuras analíticas de mérito, porém a sua sensibilidade pode ser estimada pela faixa linear dinâmica utilizada (8,8 a 880 x 10^{-7} mol L^{-1}). O autor afirma que a sensibilidade deste método é vinte vezes superior a determinação da primaquina sem nenhuma complexação.

El-Brsahy[28] (1993) propôs um método baseado na formação de complexo da primaquina com 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) formando um ânion

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

estável e detectável na região do visível (λ_{Max} = 845 nm). Segundo o autor, a FLD deste método é de 2,2 a 8,8 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Amin[29] (2000) propôs um método espectrofotométrico baseado na formação do complexo corado entre a primaquina e a calmagite. Este complexo possui um máximo de absorção em 666 nm e uma FLD de 2,2 a 72,6 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Estas determinações espectrofotométricas descritas foram feitas em meio líquido e necessitam de etapas de separação, pois muitos concomitantes presentes nas amostras podem absorver radiação específica, interferindo nos resultados analíticos. A sensibilidade desses métodos, em geral, faz com que as determinações de primaquina sejam inviáveis em fluidos biológicos.

Mudando um pouco a técnica de detecção, mas ainda fazendo uso da complexação, Amin [30] (2003) em outra publicação, propôs um método para determinação da primaquina em formulações farmacêuticas baseados na medida de condutividade dos complexos formados entre a primaquina e tiocianato de Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} ou Zn^{2+}, e também na determinação indireta destes complexos por espectrometria de absorção atômica. Esses métodos requerem etapas para separação prévia dos complexos antes da determinação do analito.

Alternativamente aos diversos métodos espectrométricos surgiram os métodos cromatográficos acoplados a diversos meios de detecção (inclusive absorção na região do UV-Vis), possibilitando a eliminação de interferências. Esses métodos são aplicados não só para determinação em formulações farmacêuticas [31], mas também em urina e em plasma. Muitas vezes auxiliando estudos médicos sobre a farmacocinética do composto.

Dua [32] (1996) apresentou um método baseado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção ultravioleta para determinação da primaquina em sangue de pessoas contaminadas com a malária do gênero Plasmodium vivax, a FLD se estendeu de 5,4 x 10^{-8} a 2,2 x 10^{-4} mol L^{-1}, e a recuperação foi de apenas 89 %.

Lal [33] (2003) propôs um método para determinação de primaquina em plasma de rato, este método é baseado na técnica HPLC acoplada a um detector ultravioleta. A curva de calibração do método possui linearidade entre 4,3 e 21,5 x 10^{-8} mol L^{-1}, envolve dupla extração para fazer orgânica e possui uma recuperação pobre de apenas 45%.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

Rajanikanth [34] (2003) propôs um método baseado na técnica HPLC acoplada a um espectrofômetro de massas para a determinação de primaquina em plasma de macaco. O método proposto apresentou uma vasta FLD (8,6 a 2196 x 10^{-9} mol L^{-1}) e ótima sensibilidade (avaliada pelo menor valor da FLD), no entanto a recuperação da primaquina em sangue foi baixa, 55-60%.

Em um artigo bem recente Dwivedi [35] (2003) propôs um método baseado na técnica HPLC e na cromatografia líquida de camada delgada de alta eficiência (HPTLC) para determinação da primaquina na presença de outros antimalariais. Neste trabalho ele usa um arranjo de fotodiodo (UV-Vis) como detector. O limite de detecção do método foi de 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. A faixa linear dinâmica se estende de 2 a 42 x 10^{-6} mol L^{-1}.

O comportamento eletroquímico da primaquina foi estudado e detalhadamente descrito na literatura, [36] [37] e em alguns trabalhos fez-s e uso deste comportamento para se fazer à determinação após métodos cromatográficos de separação.

Endoh [38] (1992) apresentou um método baseado na técnica HPLC com detecção amperométrica para determinação de primaquina em plasma de Bezerros, conseguindo um limite de detecção de 2,1 x 10^{-8} mol L^{-1}. A recuperação deste método está na faixa de 89,5 a 92,8 %.

Dean [39] (1994) utiliza a HPLC acoplada a um detector eletroquímico, para determinação da primaquina em plasma. Este método apresentou limite de detecção de 4 x 10^{-9} mol L^{-1} e uma recuperação em torno de 100%.

Um método eletroquímico foi proposto por Saad [40] (1992), neste, a determinação da primaquina em formulações farmacêuticas é feita utilizando um eletrodo baseado em membrana de poli(vinilcloreto) contendo um éter de coroa macrocílica para determinação potenciométrica. Este método possibilita a determinação da primaquina na presença de cátions metálicos, cloroquina e drogas sulfonamidas. A recuperação alcançada foi de 107,0% com um coeficiente de variação relativo de 8%. A FLD foi de 1 a 100 x 10^{-5} mol L^{-1}. Este método se mostra aplicável para determinação da primaquina em formulações farmacêuticas, mas não em fluidos biológicos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA

1.3
Objetivos

A proposta do presente trabalho é o de desenvolver metodologias analíticas sensíveis e seletivas o suficiente para se fazer as determinações tanto do ciclofenil quanto da primaquina em formulações farmacêuticas e para a determinação em urina humana. Pretendeu-se obter uma marcha analítica mais simples que as já apresentadas na literatura, usando instrumentação acessível e de relativo baixo custo visando o controle e qualidade dos medicamentos contendo esse princípio ativo e sua determinação em urina. Nesse sentido as técnicas eletroanalíticas de potencial controlado, mais propriamente a voltametria nos eletrodos usuais de carbono e de mercúrio, foi escolhida.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212140/CA