



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

TITTO AUGUSTUS QUEIROZ FERRAZ

**DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM MATÉRIAS-
PRIMAS: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS**

Recife – PE
2024

TITTO AUGUSTUS QUEIROZ FERRAZ

**DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM MATÉRIAS-
PRIMAS: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Disciplina de TCC II como parte dos requisitos
para conclusão Curso de Graduação em
Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Lucas José de Alencar
Danda

Recife – PE

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ferraz, Titto Augustus Queiroz.

DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM
MATÉRIAS-PRIMAS: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS

CROMATOGRÁFICOS / Titto Augustus Queiroz Ferraz. - Recife, 2024.

33 p. : il., tab.

Orientador(a): Lucas José de Alencar Danda

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2024.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Clofazimina. 3. Hanseníase. 4.
Dapsona. I. Danda, Lucas José de Alencar. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 27/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria
(Presidente e Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Lucas José de Alencar Danda
(Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Me. Igor Eduardo Silva Arruda
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Júlia Morais Fernandes
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me proporcionado saúde para completar este ciclo da minha vida. Aos meus amados pais, Dallas e Sandra, meu único e querido irmão, Dallas, e minha futura esposa, Fabrícia. Meus tios e primos que sempre me apoiaram. Ao meu estimado amigo e orientador, Lucas Danda. Aos meus professores do departamento de ciências farmacêuticas, em especial ao professor Antônio Rodolfo de Faria. Meu querido amigo e inspiração na minha jornada no curso de farmácia, Saulo Henrique. Aos meus colegas de sala que me acompanharam nesta jornada, especialmente Alberto Cruz, Giovanna Campos, Guilherme Santos e Maria Eduarda. Aos meus queridos amigos da minha terra, Marcelo Aleixo e os irmãos Lucas, Mateus e Douglas Torres. Menciono meus amigos de outros grupos de estudo, Mateus Lamarque, Lucas Fuillarar, Thiago Sakata e Dante Gabriel. Ao saudoso Jociene Mendonça. E a todos os outros que, porventura, tenham me apoiado de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, é um desafio global de saúde pública, afetando várias faixas etárias e ambos os sexos. Em 2021, a OMS notificou cerca de 140 mil novos casos em todo o mundo, com o Brasil representando aproximadamente 13% desse total. O tratamento atual da hanseníase no Brasil compreende o uso de três fármacos seguindo o protocolo poliquimioterápico com a clofazimina, dapsona e rifampicina. Estes fármacos possuem mecanismos de ação distintos e características físico-químicas diferentes entre si, e atualmente são administrados de forma separada em suas formulações próprias. É de grande importância para o desenvolvimento de novos medicamentos ter disponíveis métodos analíticos de controle de qualidade, e um dos principais utilizados no cotidiano de indústrias é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é amplamente utilizada no controle de qualidade dos fármacos utilizados na hanseníase, e o presente trabalho apresenta, através da interpretação de ensaios feitos por meio de um planejamento fatorial completo do tipo 3^2 , onde o pH (X1) e a molaridade do tampão da fase móvel (X2) foram avaliados em 3 níveis (menor, médio e maior), a condição cromatográfica do tampão da fase móvel com pH 5,8 e 50 mM de acetato de amônio em mistura com metanol no comprimento de onda de 293 nm para picos bem definidos, com fator de cauda dentro dos padrões, número de pratos teóricos e tempo de retenção satisfatórios para análise simultânea da clofazimina e dapsona. Também foi levado em conta o valor das colunas cromatográficas e dos solventes e componentes da fase móvel para se ter uma análise de custo menor e mais rápida, gerando economia em cada análise injetada no equipamento.

Palavras-chave: clofazimina; dapsona; cromatografia líquida de alta eficiência; ultravioleta.

ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, poses a global challenge to public health, affecting various age groups and both sexes. In 2021, WHO reported approximately 140 thousand new cases worldwide, with Brazil representing about 13% of this total. The current treatment for leprosy in Brazil involves the use of three drugs following the multidrug therapy protocol with clofazimine, dapsone, and rifampicin. These drugs have distinct mechanisms of action and different physicochemical characteristics and are currently administered separately in their own formulations. It is of great importance for the development of new medications to have available analytical methods for quality control, and one of the main methods used in industry is high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC is widely used in the quality control of drugs used in leprosy, and this study presents, through the interpretation of assays performed using a full factorial design of type 32, where the pH (X1) and the molarity of the mobile phase buffer (X2) were evaluated at 3 levels (low, medium, and high), the chromatographic condition of the mobile phase buffer with pH 5.8 and 50 mM ammonium acetate in mixture with methanol at a wavelength of 293 nm for well-defined peaks, with tailing factor within standards, theoretical plate number, and retention time satisfactory for simultaneous analysis of clofazimine and dapsone. The value of chromatographic columns and mobile phase solvents and components were also considered to have a lower and faster cost analysis, generating savings with each injection into the equipment.

Keywords: clofazimine; dapsone; high-performance liquid chromatography; ultraviolet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1** – Esquema das possíveis ações da clofazimina na célula bacteriana..... 16
- Figura 2** – Estrutura molecular de clofazimina. 16
- Figura 3** – Estrutura molecular da dapsona. 17
- Figura 4** – Cromatogramas típicos das injeções de CLZ e DAP utilizando as condições de gradiente descritas no Quadro 1.....26
- Figura 5** – Formas iônicas (direita e meio) e molecular (esquerda) de dapsona. Constantes de ionização ácida (pK_a) referentes à região da amina primária da qual estão indicando.....28
- Figura 6** – Espécies ionizada (A) e molecular (B) de clofazimina em meio aquoso.29
- Figura 7** – Gráficos de superfície de resposta demonstrando o efeito do pH e da molaridade dos tampões empregados nas respostas de pratos teóricos (esquerda superior), tempo de retenção (direita superior) e fator de cauda (inferior) de clofazimina analisada por HPLC-DAD.29

QUADROS

- Quadro 1** – Condições cromatográficas iniciais para avaliação das colunas.....23
- Quadro 2** – Desenho experimental do tipo 3² para avaliação de pH e molaridade da fase móvel.....23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos adversos do tratamento recomendado pelo protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da hanseníase no Brasil.....	18
Tabela 2 – Características físico-químicas de interesse de clofazimine e dapsone.....	18
Tabela 3 – Métodos para determinação de clofazimina e dapsona selecionados da literatura....	21
Tabela 4 – Resultados das injeções de CLZ e DAP nas diferentes colunas testadas no estudo..	25
Tabela 5 – Análise de custo (em BRL) por análise cromatográfica do método desenvolvido....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	HANSENÍASE.....	13
2.2	CLOFAZIMINA E DAPSONA	15
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	19
2.4	DETERMINAÇÃO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM MATRIZES SIMPLES ..	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAIS	22
3.2	SISTEMA CROMATOGRÁFICO	22
3.3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	22
3.3.1	Seleção da coluna cromatográfica	22
3.3.2	Planejamento experimental para avaliação do tampão da fase móvel	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1	AVALIAÇÃO e SELEÇÃO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA	25
4.2	OTIMIZAÇÃO DE MODIFICADOR AQUOSO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	28
5	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase, uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, representa um desafio significativo de saúde pública em escala global, afetando diversas faixas etárias e ambos os sexos. Em 2021, a Organização Mundial de Saúde (OMS) notificou aproximadamente 140 mil novos casos em todo o mundo, sendo o Brasil responsável por cerca de 13% desse total, com aproximadamente 18 mil novos casos no mesmo ano. Esta enfermidade, além de suas manifestações clínicas na pele, olhos e outros tecidos, destaca-se pela sua capacidade de ocasionar danos nos nervos periféricos, gerando consequências físicas e sociais por causa suas lesões (“Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde bvsms.saude.gov.br Hanseníase | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico”, 2023).

A compreensão da hanseníase abarca duas facetas essenciais: a infecção crônica pelo *M. leprae* e os danos neurais resultantes de respostas imunológicas. O *M. leprae* tem afinidade pelas células de Schwann, células de suporte do sistema nervoso periférico, desencadeando respostas imunológicas que culminam em danos aos nervos periféricos. A classificação clínica da doença em formas como Hanseníase Indeterminada, Tuberculóide, Virchowiana e Borderline reflete a diversidade de manifestações clínicas, cuja determinação requer avaliação clínica e laboratorial detalhada.

Os avanços no diagnóstico da hanseníase incluem técnicas como intradermoreação, baciloscopia, diagnóstico histopatológico, sorologia e imuno-histoquímica, fornecendo uma gama de abordagens para identificação e classificação da doença. Além disso, a OMS propõe uma classificação baseada no número de lesões e resultados de baciloscopia, categorizando os pacientes em paucibacilares e multibacilares. O tratamento evoluiu ao longo do tempo, culminando no esquema poliquimioterápico (PQT), que combina fármacos como a clofazimina, dapsona e rifampicina que são amplamente utilizados no protocolo clínico e diretriz terapêutica da hanseníase (BOECHAT; PINHEIRO, 2012).

A Clofazimina, uma molécula lipofílica pertencente à classe das riminofenazinas, inicialmente desenvolvida como descolorante, revelou atividade contra micobactérias em 1957. Seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido, embora evidências sugiram que interfere no ciclo redox, facilitando a produção de peróxidos que afetam a produção de ATP. Além disso, sua natureza lipofílica desestabiliza a membrana bacteriana, interferindo na cadeia respiratória e levando à morte bacteriana. Apesar das discussões sobre os mecanismos exatos,

é claro que a Clofazimina compromete as quantidades necessárias de ATP para a homeostase bacteriana.

No entanto, a longa história de uso da Clofazimina no tratamento da hanseníase vem acompanhada de diversos efeitos adversos conhecidos. Entre eles, destacam-se sintomas de irritação gastrointestinal e coloração avermelhada/marrom na pele e nos tecidos conjuntivos devido ao acúmulo da molécula. Problemas gastrointestinais comuns incluem náuseas, diarreia, vômitos e dores abdominais, enquanto complicações mais graves, como sangramentos, infarto esplênico e obstruções intestinais, são raras, mas possíveis (CHOLO et al., 2012a).

A dapsona, uma sulfona reconhecida principalmente por suas propriedades antimicobacterianas, foi sintetizada no início do século XX e posteriormente estudada como um antibiótico em 1937. Seu potencial contra a micobactéria da hanseníase foi confirmado em 1945, demonstrando eficácia na eliminação do agente etiológico. O mecanismo de ação da dapsona na hanseníase envolve sua interferência na síntese de ácido fólico na micobactéria, competindo pela transformação do ácido para-aminobenzóico em seu subproduto desidropteroato, essencial para a síntese do ácido fólico, além de modular a quimiotaxia dos leucócitos, influenciando a secreção de interleucinas.

Os efeitos adversos da dapsona, amplamente documentados devido à sua utilização prolongada no tratamento da hanseníase, são classificados em dois tipos: dose-dependentes e hipersensibilidade à dapsona. Os efeitos dose-dependentes incluem metemoglobinemia, aplasia de medula óssea, náuseas, dispneia, taquicardia, anemia hemolítica e, em casos raros, cianose. Por outro lado, a hipersensibilidade à dapsona, embora mais rara (afetando cerca de 2,5% dos casos), apresenta uma mortalidade de quase 10%, destacando-se como uma reação eosinofílica significativa associada ao uso dessa substância (SAGO; HALL, 2002).

As moléculas da dapsona e clofazimina possuem características físico-químicas distintas, e estas diferenças também se mostram de grande importância na hora de desenvolver medicamentos que as contêm. Uma parte substancial do desenvolvimento de medicamentos é o controle de qualidade, sabendo disso, são empregadas diversas metodologias de quantificação dos princípios ativos nas mais diversas matrizes. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma ferramenta poderosa de separação quando acoplado a um sistema de detecção compatível com as características das moléculas (MACHADO et al., 2018a).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é fundamentada na interação entre os constituintes da amostra e uma fase estacionária, geralmente presente em uma coluna cromatográfica, bem como um solvente móvel que os transporta através dessa fase. A separação ocorre devido às distintas afinidades dos componentes pela fase estacionária e pelo solvente

móvel, resultando em diferentes tempos de retenção e, conseqüentemente, em diferentes eluições dos analitos.

A eficiência elevada da HPLC é obtida por meio de diversos mecanismos, como o uso de partículas de fase estacionária de tamanho reduzido e colunas cromatográficas de alta resolução, que proporcionam uma separação mais nítida e uma melhor resolução entre os picos cromatográficos. Adicionalmente, o controle preciso das condições experimentais, como a composição do solvente móvel, o fluxo da fase móvel e a temperatura, desempenha um papel crucial na eficiência e precisão da técnica (QUEIROZ et al., 2003).

Tendo isto em vista, há um desafio de como selecionar uma condição cromatográfica com bons índices, de fácil replicação, econômica e efetiva para a quantificação simultânea destes fármacos em uma matriz simples para fins de utilização em controles de qualidade.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método cromatográfico eficiente para separação simultânea de clofazimina e dapsona em matérias-primas farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de diodos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar e adaptar condições cromatográficas pré-existent para definir um ponto de partida;
- Investigar colunas como fase estacionária para aplicação no método, utilizando como critérios a eficiência dos parâmetros cromatográficos e o custo por análise;
- Investigar o efeito de tampões como modificadores aquosos da fase móvel, avaliando critérios de pH e molaridade do tampão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa de caráter crônico ocasionada pelo *Mycobacterium leprae*, um agente etiológico bacteriano bacilar capaz de ocasionar diversas complicações em tecidos, tais como olhos, pele e nervos periféricos. Esta doença transmissível atinge todas as faixas etárias e sexos, tanto no Brasil como no mundo, e se mostra como um problema ainda crescente. Em 2021, a Organização Mundial de Saúde (OMS) notificou cerca de 140 mil novos casos no planeta, e o Brasil representa cerca de 13% deste número, com aproximadamente 18 mil novos casos neste ano (“Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde bvsmms.saude.gov.br Hanseníase | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico”, 2023).

A doença é compreendida de forma mais completa se for considerada e dividida em duas partes importantes, que são a própria infecção crônica pelo *M. leprae* e um problema ocasionado pela sua presença, que são os danos causados aos nervos, explicados por alguns eventos de cunho imunológico. Apesar da possibilidade de cura desta primeira parte da doença, a infecção crônica, os danos ocasionados no sistema nervoso podem perdurar e continuar causando transtornos físicos e até mesmo sociais através do estigma (MENDONÇA et al., 2008).

Por se tratar de um agente intracelular, a sua capacidade de causar debilidades está muito ligada à resposta imune. O *M. leprae* possui uma preferência para se desenvolver nas células de Schwann humanas, que por sua vez são células de suporte do sistema nervoso periférico. As células de Schwann possuem a capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos TCD4+, e as células infectadas acabam sofrendo ataques dos próprios linfócitos citotóxicos, prejudicando o suporte dos nervos, onde se iniciam as manifestações neuropáticas (Mendonça et al., 2008). Existe um sistema de classificação para as formas como esta doença pode se manifestar, pois os mecanismos que definem a severidade da infecção também são explicados pelo comportamento imunológico do acometido. Assim, compreende-se que a doença pode se encontrar em alguma destas formas: Hanseníase indeterminada (HI), Hanseníase tuberculóide (HT), Hanseníase virchoviana (HV) ou Hanseníase borderline (HB).

Cada uma destas fases é marcada por uma característica. A HI geralmente se apresenta como início de infecção com poucos ou nenhum dos sintomas, podendo ter uma cura espontânea. Já a HT apresenta alguns dos aparecimentos clássicos de placas na pele e o aparecimento de granulomas tuberculóides que podem causar danos em pequenas ramificações

de nervos superficiais ou profundos. O tipo HV é marcado por alta positividade na baciloscopia, o que indica alto grau de contágio deste paciente, e já possui infiltração em tecidos e mucosas de maior importância, podendo ter complicações graves de motilidade e perda de função em extremidades de membros caso não seja tratada. A HB, ou dimorfa, irá se comportar ora como HV e ora como HT, podendo ter comprometimento assimétrico da face e cabeça como um todo, sendo um dos marcadores desta fase as lesões no pescoço e nuca (BOECHAT; PINHEIRO, 2012).

A determinação destas fases está ligada tanto com os achados clínicos quanto com os achados laboratoriais, e existem diversas formas de se determinar tanto a fase quanto se de fato o paciente observado é portador da doença. Existem diversas técnicas de se obter informações acerca da infecção, dentre elas estão a intradermoreação, baciloscopia, diagnóstico histopatológico, sorologia e imuno-histoquímica (CARLOS LASTÓRIA; APARECIDA MILANEZ MORGADO DE ABREU, 2012).

Além destas formas, a OMS indica uma classificação das pessoas infectadas em Paucibacilares, quando se tem até cinco pontos de lesão visíveis na pele que apresentam baciloscopia negativa, ou Multibacilares quando o indivíduo apresenta mais que as cinco lesões e estas positivam no ensaio de baciloscopia. Existem formas da doença que apenas causam danos a nível nervoso ou apenas apresentam lesões pós início de tratamento (ALVES et al., 2022).

O tratamento desta doença negligenciada tem um histórico de tentativas até o esquema terapêutico que se tem hoje estabelecido no Brasil, o primeiro medicamento desenvolvido tem como princípio ativo a dapsona. Este fármaco é da década de 40 do século passado, e apresenta diversos efeitos colaterais e uma certa ineficácia se utilizado em monoterapia para tratar a hanseníase. Outro fármaco utilizado é a clofazimina, que também teve um histórico semelhante, tendo sido utilizado em esquemas de monoterapia e não conseguindo ter tanto êxito.

Um princípio ativo que foi amplamente utilizado em esquemas monoterápicos na década de 60 é a rifampicina, que também possui efeitos colaterais de grande importância e por isso necessita de um espaçamento entre dosagens para controlar sua toxicidade. Estes fármacos citados são hoje o centro do esquema poliquimioterápico (PQT) para hanseníase. O esquema PQT exige que o paciente tome dosagens mais frequentes da dapsona e clofazimina enquanto existem dosagens espaçadas de Rifampicina, fazendo uso de diferentes abordagens dos seus mecanismos de ação em favor do infectado (BOECHAT; PINHEIRO, 2012).

Outros medicamentos também são utilizados para casos mais específicos e fases diferentes da doença que necessitem combater sintomas mais específicos. Alguns dos fármacos

que compõem estes tratamentos adjuvantes são os Anti-inflamatórios esteroidais, talidomida, tetraciclina, protionamida e alguns outros antibióticos de outras classes farmacológicas também já foram tentativas passadas e ainda são tentativas presentes (BOECHAT; PINHEIRO, 2012).

2.2 CLOFAZIMINA E DAPSONA

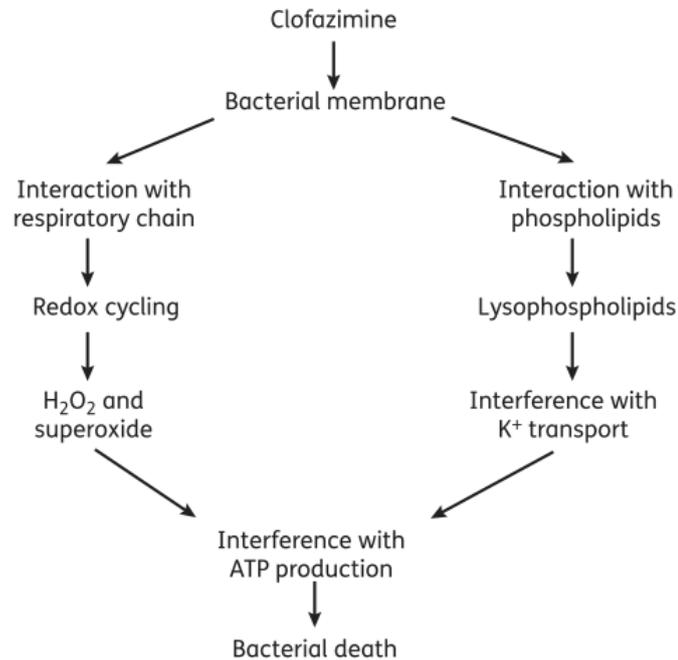
A Clofazimina é uma molécula fortemente lipofílica, da classe das riminofenazinas, que possuem o núcleo fenazina que confere a sua característica avermelhada muito marcante. A clofazimina é um pigmento que foi idealizado para o uso de descolorante de fluidos e tecidos, então, em 1957, se observou atividade contra micobactérias. Inicialmente houve estudos sobre sua ação no *Mycobacterium tuberculosis* mas sua efetividade deixou a molécula com uso suspenso até o seu uso contra o agente etiológico da hanseníase (CHOLO et al., 2012a).

O mecanismo de ação da clofazimina é ainda objeto de discussão, pois não está completamente elucidado, porém já são atribuídas algumas ações da clofazimina em alvos conhecidos da micobactéria, como por exemplo agir no ciclo redox como um redutor e facilitar a produção de peróxidos que irão interferir fortemente na produção de ATP e também suas características lipofílicas fazem com que esta molécula enquanto na membrana desestabilize o ambiente através de sua interação com os lisofosfolídeos ocasionando o mal funcionamento de canais de potássio que também irão interferir na cadeia respiratória e produção de ATP levando à morte da micobactéria (CHOLO et al., 2012b).

Portanto apesar de existir um embate de ideias sobre qual mecanismo pode predominar sobre o outro, fica claro que a interferência nas quantidades necessárias de ATP para manter a homeostase bacteriana é o que ocorre, como demonstra o esquema da Figura 1.

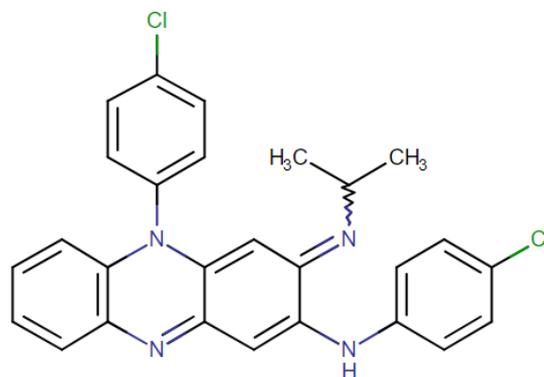
A Clofazimina apresenta diversos efeitos adversos já bem conhecidos por conta de sua longa história no tratamento da hanseníase, porém dentre eles se destacam os sintomas de irritação gastrointestinal e uma coloração avermelhada/marrom na pele e nos tecidos conjuntivos, ocasionada pelo acúmulo nos tecidos conjuntivos desta molécula que possui uma cor bem marcante. Dentro dos problemas gastrointestinais estão descritas náuseas, diarreias, vômitos e dores abdominais. Alguns casos mais raros podem acompanhar situações mais difíceis como por exemplo problemas sérios como sangramentos, infarto esplênico e obstruções intestinais (CHOLO et al., 2012b). A sua facilidade de penetração em tecidos se deve a sua estrutura bastante lipofílica, que pode ser observada na Figura 2.

Figura 1 – Esquema das possíveis ações da clofazimina na célula bacteriana.



Fonte: Extraído de (CHOLO et al., 2012a)

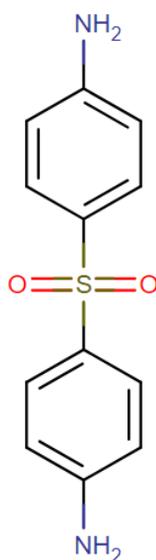
Figura 2 – Estrutura molecular de clofazimina.



Fonte: O autor (2024).

A dapsona (Figura 3) é uma molécula que pertence a classe das sulfonas, é primordialmente considerada um antimicobacteriano por sua capacidade de agir contra as micobactérias. Ela foi sintetizada no começo do século 20 e posteriormente correram estudos para sua utilização como um antibiótico no tratamento da tuberculose no ano de 1937, só então passados mais alguns anos teria sido testada sua capacidade de atuação contra a micobactéria da hanseníase em 1945, onde foi possível constatar que havia um bom potencial de eliminação do agente etiológico (DE LIMA FRANCO et al., 2018).

Figura 3 – Estrutura molecular da dapsona.



Fonte: O autor (2024).

Sua introdução inicial se deu de forma parenteral e posteriormente oral em 1949, e sua atividade bacteriostática fez com que esta droga tenha se tornado a principal forma de tratar a hanseníase, sendo feita a monoterapia por décadas. Além de ter efeitos bacteriostáticos a dapsona tem propriedades anti-inflamatórias e é utilizada em diversas outras doenças, mas esta particularidade dela também tornou interessante seu uso já que há diversos problemas inflamatórios nos pacientes de hanseníase (HILDER; LOCKWOOD, 2020).

O mecanismo de ação da dapsona no tratamento da hanseníase se dá por sua interferência na obtenção do ácido fólico na micobactéria, ele age por competição impedindo a transformação do ácido para-aminobenzóico em seu subproduto desidropteroato fazendo com que não seja possível completar a síntese do ácido fólico, já que esta molécula é necessária para completar estas reações. E sobre o mecanismo que confere a esta molécula a capacidade anti-inflamatória, não se sabe ao certo como isto ocorre, porém é sabido que ela é capaz de modular a quimiotaxia da série branca fazendo com que haja respostas diferentes a nível da secreção de interleucinas (SAGO; HALL, 2002).

Seus efeitos adversos são bem documentados por ter sido utilizada durante tanto tempo como tratamento da hanseníase. Existe dois tipos de efeitos adversos associados ao uso contínuo de dapsona, os efeitos que são dose dependente e a hipersensibilidade á dapsona. Dentro do primeiro tipo, é frequente a apresentação de metemoglobinemia, aplasia de medula óssea, náuseas, dispinéia, taquicardia, anemia hemolítica e cianose em alguns casos. O segundo tipo,

que envolve a hipersensibilidade, é mais raro de acontecer (cerca de 2,5% dos casos) porém possui mortalidade de quase 10%, o que faz desta reação eosinófila bastante importante nos estudos envolvendo a dapsona (HILDER; LOCKWOOD, 2020).

Em um contexto geral do tratamento da hanseníase, a combinação de outras drogas com a dapsona tendem a desenvolver outros efeitos adversos, como pode-se observar na Tabela 1 (DE LIMA FRANCO et al., 2018).

Tabela 1 – Efeitos adversos do tratamento recomendado pelo protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da hanseníase no Brasil.

Protocolo terapêutico	Efeitos adversos
Clofazimina + Dapsona	Agranulocitose
Clofazimina + Dapsona + Rifampicina	Gastrite, astenia, dermatite esfoliativa, mialgia, dermatite alérgica, hiporexia, insônia, edemas e eritema faciais
Dapsona + Rifampicina	Síndrome da dapsona

Fonte: Adaptado de DE LIMA FRANCO et al. 2018

O esquema de tratamento da hanseníase normalmente envolve a utilização da combinação da dapsona, clofazimina e rifampicina. A rifampicina tem esquema terapêutico mensal enquanto as duas primeiras são de uso diário, por esta razão o interesse em se ter apenas um medicamento que combine as duas drogas é muito benéfico para pacientes em tratamento. Portanto, juntamente com o desenvolvimento de um medicamento que faça a união destas drogas, deve existir um esforço em se ter métodos de quantificação simultâneo para estas drogas em matrizes simples, para fins de uso de controle de qualidade.

Apesar destas moléculas terem características físico-químicas muito distintas, como se pode observar na Tabela 2, existe diversos trabalhos que os quantificam de formas separadas utilizando das mais variadas técnicas, como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tabela 2 – Características físico-químicas de interesse de clofazimine e dapsona.

Molécula	Peso Molecular	pK _a	logP
Clofazimina	473,4 g/mol	8,51	7,1
Dapsona	248,3 g/mol	2,41	1

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia num contexto geral é uma técnica analítica muito útil que é utilizada para separar componentes que estejam em uma mistura. A forma com que a separação ocorre é com base nas diferenças de afinidade dos diversos componentes que uma mistura pode ter em relação aos componentes de uma fase estacionária, fazendo com que tudo o que esteja na fase móvel acabe sendo separado. Outro aspecto importante da cromatografia é que é uma técnica que serve não apenas para separar, mas também para identificar os componentes da mistura, visto que algumas substâncias caso submetidas à específicos cenários irão se comportar sempre da mesma forma, dando como feedback as mesmas bandas, tempos ou quaisquer que seja o parâmetro avaliado nesta análise (COLLINS, 2006).

Tendo isto em mente, existe um tipo específico de cromatografia, que é a CLAE, que segue os mesmos princípios, porém possui suas próprias singularidades e usos. Essa técnica se baseia na interação entre os componentes da amostra e uma fase estacionária, geralmente contida em uma coluna cromatográfica, e um solvente móvel que os transporta através dessa fase. A separação ocorre devido às diferentes afinidades dos componentes pela fase estacionária e pelo solvente móvel, resultando em diferentes tempos de retenção e, portanto, em diferentes eluições dos analitos (COLLINS, 2006).

A alta eficiência da CLAE é alcançada através de vários mecanismos, incluindo o uso de partículas de fase estacionária de tamanho reduzido e colunas cromatográficas de alta resolução, que permitem uma separação mais nítida e uma melhor resolução entre os picos cromatográficos. Além disso, o controle preciso das condições experimentais, como a composição do solvente móvel, o fluxo da fase móvel e a temperatura, contribui significativamente para a eficiência e precisão da técnica (COLLINS, 2006).

O tipo de detecção do analito depende de suas características, conhecer bem as propriedades físico-químicas da molécula irá ajudar na hora de decidir o tipo de detector que irá gerar o pico analítico no cromatograma. Há diversos tipos de detectores disponíveis, como por exemplo os de fluorescência para analisar moléculas que podem emitir sinais que sejam detectados por este aparelho. Há os detectores UV/visível que são amplamente utilizados em diversas áreas de estudo, incluindo a farmacêutica; há também como acoplar o sistema de cromatografia ao espectrômetro de massas para que após a separação seja feita a análise (COLLINS, 2006).

A representação do sinal analítico em um cromatograma é dada por um pico em um determinado tempo sob certas circunstâncias preestabelecidas para a análise, portanto, o que se

avalia quanto à qualidade deste sinal são algumas características inerentes da coluna cromatográfica e da performance do cromatograma num contexto geral. Estes parâmetros são definidos como pratos teóricos, fator de cauda, tempo de análise e altura do pico (COLLINS, 2006).

Os pratos teóricos por definição são uma forma de avaliar a capacidade de uma coluna cromatográfica conseguir separar bem os elementos sendo estudados, portanto, quanto mais pratos teóricos uma coluna cromatográfica oferece, maior serão a quantidade de etapas de separação acontecendo na análise de CLAE. Os pratos teóricos influenciam diretamente na largura e altura dos picos, pois, uma melhor separação fará com que as moléculas de um analito consigam ser detectadas em um mesmo momento pelo detector, fazendo com que a dinâmica do pico seja completamente afetada pela quantidade dos pratos teóricos. Já o fator de cauda será a simetria deste pico, que irá transparecer de forma numérica como foi a distribuição das moléculas no momento da análise pelo detector. Como pode haver diversas espécies iônicas diferentes de uma mesma molécula, o fator de cauda irá se modificar ao longo de diferentes ambientes de análise, onde o pH ou molaridade de uma possível solução tampão, por exemplo, poderá modular as características físico-químicas do analito, fazendo com que isso seja representado por uma cauda assimétrica ou não no cromatograma (COLLINS, 2006).

O tempo de análise é um aspecto importante na CLAE, pois indica uma otimização nos processos de desenvolvimento do método. As vantagens de se ter um tempo de análise curto vão desde a economia em fases móveis quanto em mostrar a real capacidade do método em produzir uma boa separação e identificação correta dos analitos. A análise ideal cromatográfica deve durar o menor tempo possível, com o menor gasto possível e com a melhor resolução possível, contanto que nenhum destes aspectos comprometa a obtenção clara e objetiva dos resultados. Portanto, encontrar um equilíbrio entre a duração da análise e a qualidade dos resultados é essencial para atender aos requisitos analíticos específicos de cada aplicação.

Por sua vez, a altura do pico é um parâmetro cromatográfico crucial na CLAE que irá desempenhar um papel fundamental na quantificação precisa dos analitos e demonstrar com clareza o quanto o método é eficiente em separar as moléculas. A resolução do cromatograma também é dependente da altura do pico, pois é sabido que todo aparelho possui um ruído de base inerente ao próprio detector, e caso a imagem do cromatograma seja maximizada é possível observar este ruído em formatos que se assemelham a picos, um pico bem definido, pontiagudo e alto é essencial para a determinação do que se está avaliando (COLLINS, 2006).

2.4 DETERMINAÇÃO DE CLOFAZIMINA E DAPSONA EM MATRIZES SIMPLES

A clofazimina e a dapsona possuem absorvidades distintas na luz visível, porém possuem uma faixa próxima no comprimento de onda 290 nm no ultravioleta possibilitando a análise simultânea dos fármacos utilizando um sensor ultravioleta após a devida separação cromatográfica (MACHADO et al., 2018b). Existem diversos trabalhos na literatura que demonstram condições cromatográficas dos dois fármacos de forma simultânea ou isolados em diversas matrizes como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 – Métodos para determinação de clofazimina e dapsona selecionados da literatura.

Fármaco(s)	Método cromatográfico e detecção	Matriz	Referência
Clofazimina	CLAE; Detector UV	Plasmática	(QUEIROZ et al., 2003)
Clofazimina e Dapsona	CLAE; Detector UV	Simples	(MACHADO et al., 2018b)
Clofazimina	CLAE; Detector UV	Simples	(Khedekar, 2017)
Dapsona	CLAE; Detector UV	Plasmática	(KWADIJK; SASTRE TORAO, 2002)
Dapsona	CLAE; Detector UV	Simples	(DE et al., 2014)
Clofazimina	CLAE; Detector UV	Plasmática	(KRISHNAN; ABRAHAM, 1992)
Dapsona	CLAE; Espectrômetro de massas	Simples	(LEISTNER; HOLZGRABE, 2021)
Clofazimina	CLAE; Detector UV	Simples	(STADEN et al., 2023)

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Dapsona (4,4' -diaminodiphenylsulfone) foi doada pelo fabricante Chongqing Huapont Shengchem Pharmaceutical Co., Ltd. (China). Clofazimina [N,5-bis(4-chlorophenyl)-3-propan-2-yliminophenazin-2-amine)] foi doada pelo fabricante MacLeods Pharmaceuticals Ltda. (India). Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de ultrapurificação Milli-Q Integral 5 (Merck S/A, Estados Unidos). Acetonitrila e metanol eram da marca J.T.Baker, grau HPLC. Os outros reagentes eram grau analíticos e foram usados assim que abertos.

3.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

O sistema cromatográfico da marca Shimadzu (Japão) era composto por uma bomba quaternária, modelo LC-10ADvp, acoplada a uma válvula solenoide modelo FCV-10ALvp e um desgaseificador modelo DGU-14 e um autoinjeter modelo SIL-10ADvp. As colunas foram acondicionadas em um forno modelo CTO-10ADvp. As detecções foram realizadas em um detector de arranjo diodo modelo SPD-10ADvp. O controle do sistema foi realizado através de uma controladora modelo SCL-10ADvp, acoplada a um computador, e o tratamento dos dados foi realizado no software LC Solution 1.25 (Shimadzu, Japão).

3.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

3.3.1 Seleção da coluna cromatográfica

Na primeira etapa, o método cromatográfico descrito por (MACHADO) foi adaptado para servir como condição de partida para avaliar e selecionar diferentes colunas cromatográficas (Quadro 1). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) com tampão acetato de amônio pH 4,8 (25 mM) em modo gradiente, a 1 mL/min de fluxo e temperatura ambiente (25 C). O programa de cada gradiente foi otimizado individualmente, respeitando as dimensões e o empacotamento de cada coluna. Soluções de CLZ e DAP na concentração de 10 µg/mL, diluídas em fase móvel, foram injetadas e os picos integrados em 293 nm. Para selecionar a coluna, parâmetros de fator de cauda (F_c) e o custo total por análise foram considerados.

Quadro 1 – Condições cromatográficas iniciais para avaliação das colunas.

Coluna	Fase móvel	Gradiente
Purospher® (C ₁₈) 75 x 4 mm (3 µm)	Acetonitrila:Tampão acetato de amônio pH 4,8 (25 mM)	0 min: 50:50 0-2 min: 70:30 2-6 min: 70:30 6-7 min: 50:50 7-10 min: 50:50
Chromolith® (C ₁₈) 100 x 2 mm (2 µm)	Acetonitrila:Tampão acetato de amônio pH 4,8 (25 mM)	0 min: 30:70 0-3 min: 70:30 3-6 min: 70:30 6-7 min: 30:70 7-10 min: 30:70
Octadecilsilano (C ₁₈) 150 x 4,6 mm (5 µm)	Acetonitrila:Tampão acetato de amônio pH 4,8 (25 mM)	0 min: 40:60 0-3 min: 70:30 3-12 min: 70:30 12-15 min: 40:60 15-20 min: 40:60
Octilsilano (C ₈) 150 x 4,6 mm (5 µm)	Metanol:Tampão acetato de amônio pH 4,8 (25 mM)	0 min: 40:60 0-3 min: 70:30 3-10 min: 70:30 10-13 min: 40:60 13-18 min: 40:60

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

3.3.2 Planejamento experimental para avaliação do tampão da fase móvel

Após a seleção da coluna cromatográfica, o tampão da fase móvel foi estudado através de um planejamento fatorial completo do tipo 3², onde o pH (X₁) e a molaridade do tampão da fase móvel (X₂) foram avaliados em 3 níveis (menor, médio e maior). A matriz experimental resultou em 9 experimentos individuais (Quadro 2).

Quadro 2 – Desenho experimental do tipo 3² para avaliação de pH e molaridade da fase móvel.

		Níveis		
Fatores independentes (variáveis)		Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
X ₁	pH	3,8	4,8	5,8
X ₂	Molaridade	10 mM	25 mM	50 mM
Fatores dependentes (respostas)				
Y ₁	Fator de cauda (T)			
Y ₂	Número de pratos teóricos (N)			
Y ₃	Tempo de retenção (T _R)			

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

O impacto de cada variável independente nas respostas de fator de cauda (Y_1), número de pratos teóricos (Y_2) e tempo de retenção (T_R) foi avaliado para melhor compreender a importância das variáveis do tampão nas separações cromatográficas de DAP e CLZ. Os efeitos foram avaliados através de análise de variância com 95% de nível de confiança e gráficos de superfície de resposta foram obtidos para demonstrar o impacto combinado dos dois fatores em respostas de interesse selecionadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE COLUNA CROMATOGRÁFICA

Na primeira etapa do trabalho, diferentes colunas cromatográficas foram avaliadas utilizando um método de partida adaptado. Diversas injeções de CLZ e DAP foram realizadas em cada coluna para otimizar as condições dos gradientes descritos na seção anterior. Percebe-se que todas as colunas obtiveram êxito em reter e separar CLZ e DAP com relativa eficiência, diferenciando-se, basicamente pela qualidade cromatográfica das separações (Figura 4).

Como a molécula de DAP possui menor $\log P$ comparada à CLZ, naturalmente, a molécula possui menor retenção em sistemas de fase reversa, com tempos de retenção variando entre 1,2-1,3 (nas colunas de menor dimensão) e 2,9-3,2 (nas colunas de maior dimensão) (Tabela 4). Os gradientes otimizados para cada coluna levaram em consideração a quantidade de fase orgânica inicial e o empacotamento das colunas para garantir que DAP nunca ficasse sem retenção e saísse conseqüentemente no tempo morto.

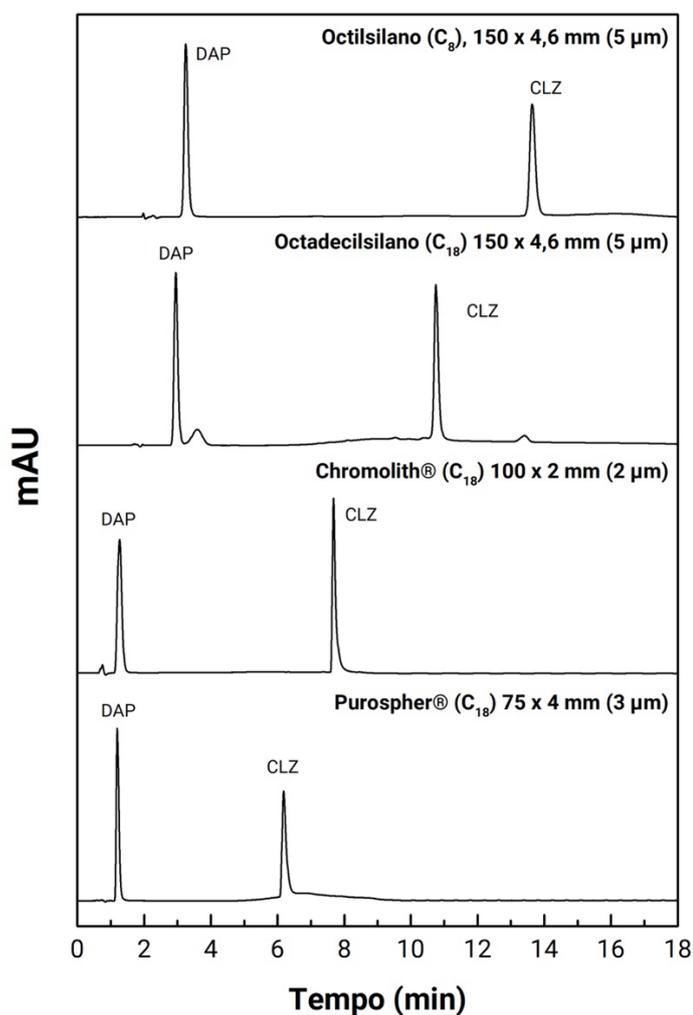
A mudança das colunas e seus respectivos gradientes refletiram, principalmente, no tempo de retenção de CLZ e qualidade cromatográfica dos picos de CLZ. Como CLZ é uma molécula bastante apolar com $\log P = 6,96$ (ChemAxon, 2024), os tempos de retenção variaram entre 6,2 e 13,6, principalmente em função das dimensões das colunas. Colunas como Chromolith® e Purospher®, as quais possuem menores volumes do cilindro e menor tamanho de partículas, demonstraram eficiência para reter CLZ.

Tabela 4 – Resultados das injeções de CLZ e DAP nas diferentes colunas testadas no estudo.

Coluna	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Altura	Fator de cauda (T)
Purospher® 75 x 4 mm (3 µm), C18	DAP: 1,2 CLZ: 6,2	DAP: 1012511 CLZ: 986136	DAP: 183608 CLZ: 111638	DAP: 1,59 CLZ: 1,91
Chromolith® 100 x 2 mm (2 µm), C18	DAP: 1,3 CLZ: 7,7	DAP: 979774 CLZ: 972618	DAP: 104988 CLZ: 137136	DAP: 1,22 CLZ: 2,44
Octadecilsilano (C18) 150 x 4,6 mm (5 µm)	DAP: 2,9 CLZ: 10,7	DAP: 989718 CLZ: 1013693	DAP: 128790 CLZ: 115517	DAP: 1,30 CLZ: 1,31
Octilsilano (C8) 150 x 4,6 mm (5 µm)	DAP: 3,2 CLZ: 13,6	DAP: 1108794 CLZ: 1072322	DAP: 136429 CLZ: 88169	DAP: 1,31 CLZ: 1,28

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 4 – Cromatogramas típicos das injeções de CLZ e DAP utilizando as condições de gradiente descritas no Quadro 1.



Fonte: O autor (2024).

Porém, ao avaliar os fatores de cauda de CLZ nas diferentes colunas (Tabela 4), percebe-se que o critério mínimo de qualidade de $F > 1,8$, estabelecido pela USP em adequabilidade de sistemas cromatográficos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2023) não foi atingido por estas colunas. O fator de cauda é um importante parâmetro de separação cromatográfica que diz respeito à forma como o composto chega ao detector. Fatores de cauda maiores representam amostras que chegam de forma diferencial ao detector, sendo “arrastadas” ao sair da coluna. Isto pode estar relacionado à forma como a molécula encontra-se ionizada naquele sistema cromatográfico, ou, ainda, à eficiência da coluna específica em reter as diferentes espécies da molécula. Portanto, apesar da rápida separação cromatográfica obtida pelas colunas Chromolith® e Purospher®, estas colunas foram desqualificadas na etapa seguinte do estudo.

A seleção entre as colunas C₁₈ e C₈ comuns de 150 x 75 mm (5 µm) levou em consideração dois fatores: a. intensidade das interações hidrofóbicas de CLZ e a coluna e b. custo total de análise. Primeiramente, considerando o elevado log*P* de CLZ citado anteriormente, a intensidade das interações hidrofóbicas levou a CLZ a ficar retida por mais tempo na coluna C₁₈ (13,6 min), quando comparada à C₈ (10,7 min). No entanto, o tempo necessário para que a coluna C₈ atingisse o equilíbrio após execução do gradiente resultou em um tempo de análise total semelhante à C₁₈. Neste caso, o critério da intensidade das interações hidrofóbicas, per se, não justificaria a escolha. O critério final de seleção da coluna, portanto, foi o de custo total por análise (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de custo (em BRL) por análise cromatográfica do método desenvolvido.

Coluna	Custo da coluna (R\$)	Fase orgânica	Volume por análise (mL)	Custo da fase orgânica por litro (R\$)	Custo da por análise (R\$)
Purospher® 75 x 4 mm (3 µm), C18	13276,00 ¹	ACN	6,1	409,00 ²	2,49
Chromolith® 100 x 2 mm (2 µm), C18	10961,00 ¹	ACN	5,0	409,00 ²	2,04
Octadecilsilano (C18) 150 x 4,6 mm (5 µm)	8210,00 ²	ACN	11,6	409,00 ²	4,74
Octilsilano (C8) 150 x 4,6 mm (5 µm)	8210,00 ²	MeOH	10,2	179,00 ²	1,83

¹ Fonte: Fisher Scientific (Nova Hampshire, Estados Unidos). Outubro, 2023.

² Fonte: Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Outubro, 2023.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

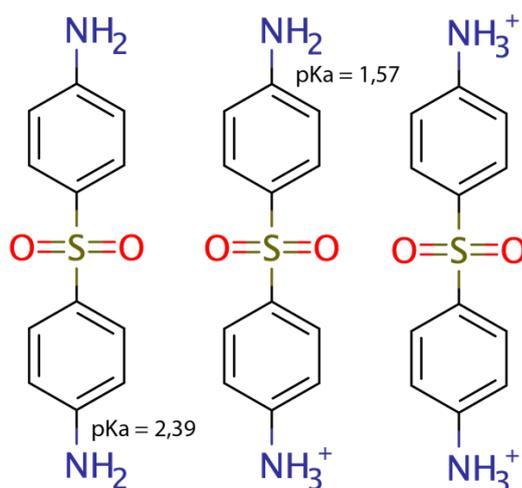
Uma vez que a CLZ possui um fator de retenção elevado na coluna C₁₈, faz-se necessário utilizar um solvente orgânico com muita força cromatográfica para separar a CLZ em tempo hábil, sendo a acetonitrila (ACN) o solvente ideal para esta situação. No entanto, o preço por litro de ACN de grau HPLC tem sido crescente nos últimos anos, especialmente após a pandemia da COVID-19. Comparado com metanol de mesmo grau, a ACN HPLC pode custar até 2,28 vezes mais. Em contrapartida, a coluna C₈ demonstra retenção relativa muito menor de CLZ, possibilitando o uso de um solvente orgânico de menor força como o metanol. O custo final por análise na coluna C₈ com metanol foi estimado em R\$ 1,83, enquanto com C₁₈ e ACN

seria R\$ 4,74. Portanto, para a etapa seguinte do trabalho, o método com coluna C₈ e metanol foi selecionado para avaliação das influências de pH e molaridade do tampão na fase móvel.

4.2 OTIMIZAÇÃO DE MODIFICADOR AQUOSO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar o impacto de mudanças no pH e molaridade na fase móvel, um planejamento experimental do tipo 3² foi executado. A molécula de DAP possui caráter básico com pK_a estimado em 2,39 (CHEMAXON, 2024) (Figura 5), a qual encontra-se no seu estado molecular na fase móvel com pH 4,8. Neste caso, o pH da fase móvel possui certa robustez quanto a ionização de DAP, exonerando a preocupação de variabilidade nos resultados da rotina.

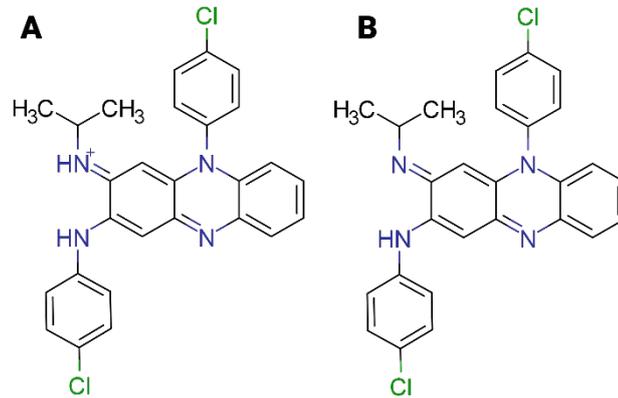
Figura 5 – Formas iônicas (direita e meio) e molecular (esquerda) de dapsona. Constantes de ionização ácida (pK_a) referentes à região da amina primária da qual estão indicando.



Fonte: O autor (2024).

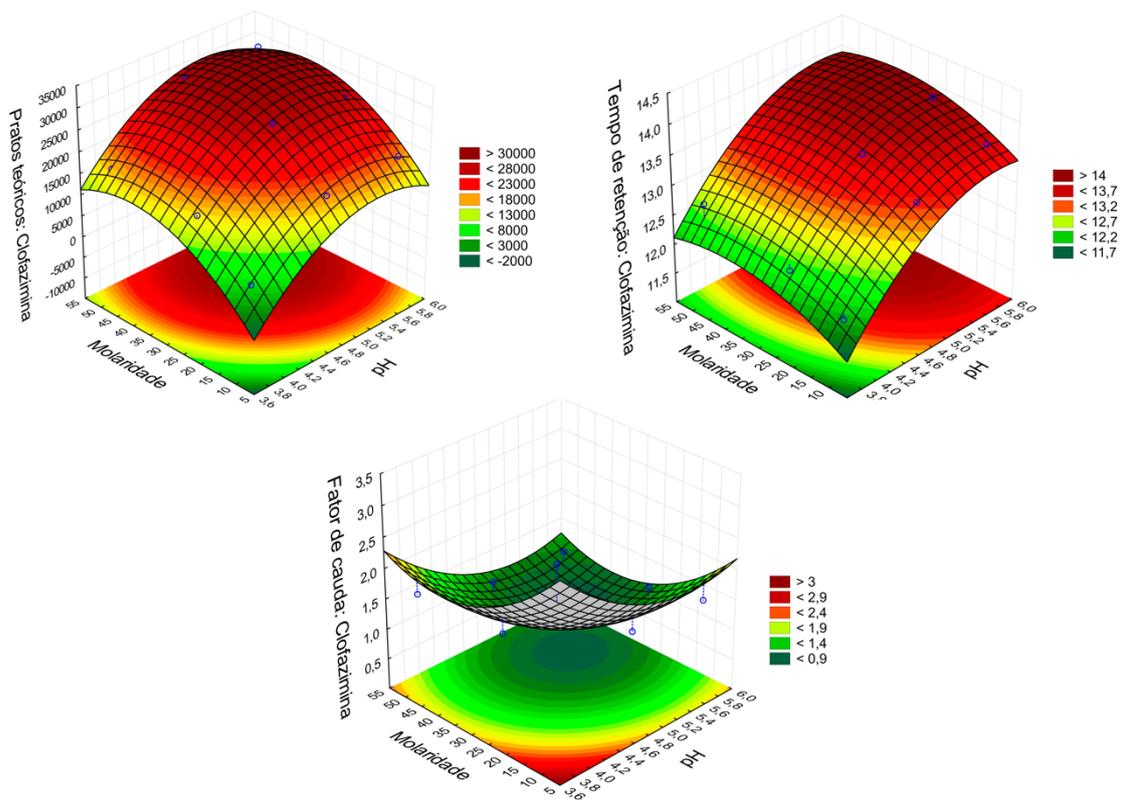
No entanto, a molécula de CLZ também possui caráter básico, porém com pK_a estimado em 6,93 por dados computacionais (CHEMAXON, 2024) (Figura 6) ou 9 por métodos experimentais (VERBIĆ et al., 2023), estando ionizada na fase móvel do método, o que levanta a seguinte questão: pequenas modificações de pH na fase móvel (na grandeza de 1 unidade) podem potencialmente alterar os parâmetros de qualidade cromatográfica de CLZ? A resposta a essa pergunta pode ser observada na Figura 7.

Figura 6 – Espécies ionizada (A) e molecular (B) de clofazimina em meio aquoso.



Fonte: O autor (2024).

Figura 7 – Gráficos de superfície de resposta demonstrando o efeito do pH e da molaridade dos tampões empregados nas respostas de pratos teóricos (esquerda superior), tempo de retenção (direita superior) e fator de cauda (inferior) de clofazimina analisada por HPLC-DAD.



Fonte: O autor (2024).

Como pode ser observado, tanto o pH quanto a molaridade do tampão influenciam profundamente a qualidade da retenção cromatográfica de CLZ, devido ao estado ionizado da molécula. De forma geral, o aumento do pH ocasionou melhora das retenções, aumentando o

número de pratos teóricos e reduzindo o fator de cauda de CLZ. Inclusive, fatores de cauda abaixo do limite especificado pela USP ($F > 1,5$) para qualidade mínima de adequabilidade do sistema (REF) foram observados em pH 3,8. Quando a fase móvel esteve em pH 5,8, no entanto, os fatores de cauda demonstraram seu menor valor, potencializando a separação de CLZ. O aumento do pH também aumentou o tempo de retenção de CLZ, uma vez que, quanto maior o pH, mais proximidade de seu pK_a e mais CLZ na forma molecular pode ser encontrada, aumentando a retenção por interações hidrofóbicas com a coluna C_8 .

O efeito da molaridade do tampão também foi estudado, onde verificou-se que maiores molaridades produziram picos com menor fator de cauda. O efeito da molaridade no tempo de retenção e pratos teóricos não foi tão significativo quanto no fator de cauda. A molaridade dos tampões de fase móvel em HPLC reflete no preparo da coluna cromatográfica para retenção de íons pelos grupamentos silanóis residuais nas colunas de fase reversa, influenciando na qualidade das separações cromatográficas. Portanto, é esperado que maiores molaridades possam influenciar positivamente na retenção e separação cromatográfica, especialmente quando as colunas não possuem substituição total dos grupamentos silanóis. Entretanto, molaridades elevadas devem ser evitadas para não ocasionar precipitação dos sais de tampões quando misturados com a fase orgânica.

Em resumo, a melhor condição do tampão da fase móvel foi encontrada com pH 5,8 e 50 mM. Maiores pHs não foram considerados devido ao efeito de pHs elevados no tempo de retenção de CLZ, o que poderia aumentar o tempo total por análise. Maiores molaridades também não foram consideradas, uma vez que 50 mM representa um valor seguro para o tampão acetato de amônio em mistura com metanol (abaixo de 70%).

5 CONCLUSÃO

Foi possível através do planejamento experimental, execução e interpretação dos resultados determinar a melhor condição cromatográfica para análise simultânea dos fármacos, levando em conta todos os parâmetros que definem uma boa análise cromatográfica e utilizando os materiais com menor custo e tempo por análise. O trabalho tem como foco análises mais voltadas para o controle de qualidade de futuros medicamentos que possuam a combinação dos princípios ativos em sua composição e que as análises sejam feitas em matriz simples, contudo, como a própria literatura mostra, é possível que com algumas adaptações o método seja também aplicado para quantificações simultâneas em matrizes como o plasma.

Se faz necessário futuros ensaios para fins de atestar a robustez para que sua utilização cotidiana seja segura, precisa e dentro dos limites de quantificação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. K. R. et al. Fisiopatologia e manejo clínico da hanseníase: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e53811932217–e53811932217, 18 jul. 2022.
- Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde bvsms.saude.gov.br Hanseníase | 2023 Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico. [s.d.].
- BOECHAT, N.; PINHEIRO, L. C. S. A Hanseníase e a sua Quimioterapia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 247–256, 18 jun. 2012.
- CARLOS LASTÓRIA, J. I.; APARECIDA MILANEZ MORGADO DE ABREU, M. I. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagn Tratamento**, v. 17, n. 4, p. 173–182, 2012.
- CHEMAXON. **Marvin**. Budapest, 2024.
- CHOLO, M. C. et al. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290–298, 1 fev. 2012a.
- CHOLO, M. C. et al. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290–298, 1 fev. 2012b.
- DE, A. et al. INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH ESTIMATION OF DAPSONE IN BULK & DOSAGE FORM BY UV SPECTROSCOPIC METHOD. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, 2014.
- DE LIMA FRANCO, I. et al. Revisão Bibliográfica de protocolos de tratamento farmacológico de Hanseníase utilizando o medicamento dapsona. [s.d.].
- HILDER, R.; LOCKWOOD, D. The adverse drug effects of dapsona therapy in leprosy: a systematic review. **Leprosy Review**, v. 91, n. 3, p. 232–243, 1 set. 2020.
- Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy. [s.d.].
- KRISHNAN, T. I.; ABRAHAM, I. A Rapid and Sensitive High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Clofazimine in Plasma'. v. 60, n. 4, [s.d.].
- KWADIJK, S.; SASTRE TORAO, J. High-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of dapsona and its hydroxylated metabolite in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 16, n. 3, p. 203–208, 1 maio 2002.
- LEISTNER, A.; HOLZGRABE, U. Impurity profiling of dapsona using gradient HPLC method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 113982, 10 maio 2021.
- MACHADO, S. et al. Chromatographic method for the simultaneous quantification of dapsona and clofazimine in nanoformulations. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 17, p. 3382–3388, 1 set. 2018a.

MACHADO, S. et al. Chromatographic method for the simultaneous quantification of dapsone and clofazimine in nanoformulations. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 17, p. 3382–3388, 1 set. 2018b.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343–350, jul. 2008.

QUEIROZ, R. H. C. et al. Determination of clofazimine in leprosy patients by high-performance liquid chromatography. **Journal of analytical toxicology**, v. 27, n. 6, p. 377–380, 2003.

SAGO, J.; HALL, R. P. Dapsone. **Dermatologic Therapy**, v. 15, n. 4, p. 340–351, 1 dez. 2002.

STADEN, D. VAN et al. Development of a HPLC Method for Analysis of a Combination of Clofazimine, Isoniazid, Pyrazinamide, and Rifampicin Incorporated into a Dermal Self-Double-Emulsifying Drug Delivery System. **Methods and Protocols 2023, Vol. 6, Page 104**, v. 6, n. 6, p. 104, 1 nov. 2023.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **General Chapter, (621) Chromatography**. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, 2023. v. USP-NF

VERBIĆ, T. Ž. et al. Clofazimine pKa Determination by Potentiometry and Spectrophotometry: Reverse Cosolvent Dependence as an Indicator of the Presence of Dimers in Aqueous Solutions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 20, n. 6, p. 3160–3169, 5 jun. 2023.