

Q. 076 05



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**

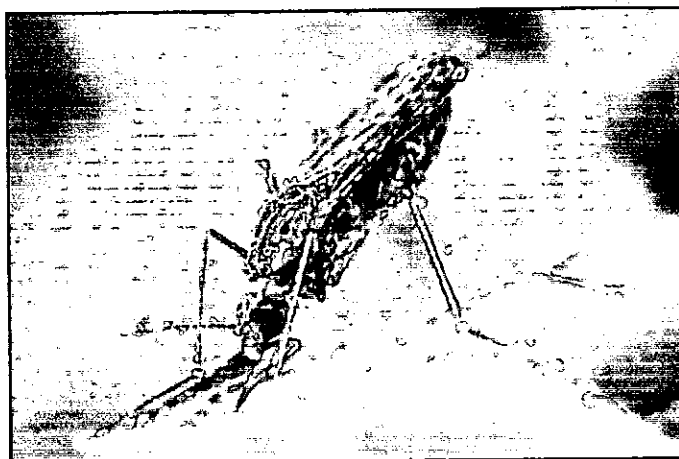


Faculdade de Ciências
Departamento de Química

Trabalho de Licenciatura

Tema:

**Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina
no Fansidar**



Autora: Muzime, Sesaltina Nora

Maputo, Março 2008



**UNIVERSIDADE
EDUARDO MONDLANE**

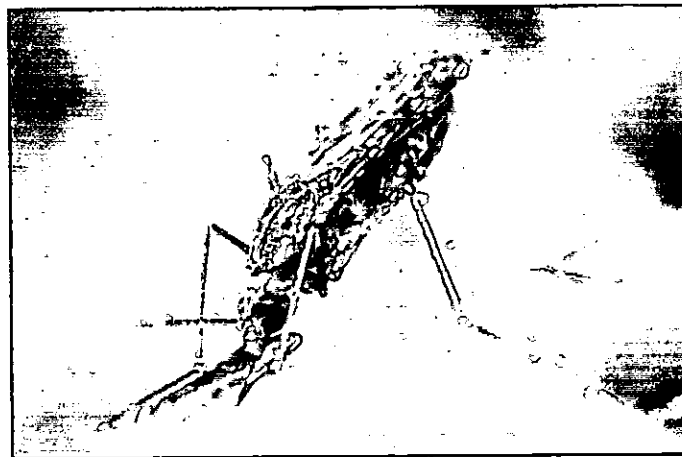


Faculdade de Ciências
Departamento de Química

Trabalho de Licenciatura

Tema:

**Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina
no Fansidar**



Autora: Muzime, Sesaltina Nora

Supervisor: Professor Doutor Victor Skripets

Co-Supervisora: Engenheira Ana Raquel Fernandes Siteo

Maputo, Março 2008

Dedicatória

A Deus,

“porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”. Romanos 11:36

A Nora Muzime Matine e Luis Matine
(Minha Querida Mãe e meu Querido Pai)
A Ancha, Leonel, Amaral e Gennifer
(Meus irmãos)
Com gratidão e amor

Dedico

Agradecimentos especiais

Ao Professor Doutor Victor Skripets pela tranquila e eficiente orientação, pela compreensão, ajuda, disponibilidade e por tudo que com ele aprendi nestes anos de estudo no Departamento de Química.

A Engenheira Ana Raquel Fernandes Siteo pelo apoio, compreensão e disponibilidade que me proporcionou.

Ao Ministério da Saúde que através do Laboratório Nacional de Controle de Qualidade de Medicamentos (LNCQM) me proporcionou todo apoio necessário para a conclusão do meu trabalho.

Ao meu querido Avô Alberto Matine, pela esperança e confiança que sempre depositou em mim.

Agradecimentos

Ao Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane, pela oportunidade concedida;

Ao Prof. Doutor Felisberto Pagula pela força, estímulo e conselhos;

Aos demais professores do Departamento de Química que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos meus colegas de carteira Nico Savaio, Samuel Chimue, Pedro Muria e Lúcia Chemane, pelo estímulo e amizade;

Aos funcionários da faculdade, especialmente a Cremilda, Dona Deolinda Muzime, Dona Madalena, Dona Amélia Furvela, Ognério e Ramiro pela cooperação e prestabilidade;

As minhas colegas de laboratório, Maria Isabel Chemane, Luseta Panguane e Fernanda Paruque, pelo optimismo, amizade, cooperação e excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram durante a elaboração desse trabalho;

A minha família, em especial aos meus Pais, irmãos e tios por compreenderem minha ausência durante esses anos de aprendizagem;

Ao Dr. Julião Monjane pelo apoio sempre que eu necessitava;

Declaração de honra

O presente trabalho de Licenciatura foi elaborado pela autora com base nos recursos a que ao longo do texto se faz referência

A autora

(Sesaltina Nora Muzime)

Maputo, aos ---de ---de 2007

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”**

Albert Einstein

I. Resumo

A malária continua a ser a infecção humana mais devastadora no mundo inteiro com 300 a 500 milhões de casos clínicos e quase 3 milhões de mortes por ano.

Em Moçambique cerca de 48% de todas consultas externas e cerca de 63% de todas admissões pediátricas nos hospitais rurais e centrais foi atribuída a malária.

Hoje em dia na quimioterapia da malária usa-se o **Fansidar** que é uma combinação de *Sulfadoxina* (500mg) e *Pirimetamina* (25 mg) que inibe os passos subsequentes envolvidos na biossíntese do ácido tetraidrofólico.

A baixa qualidade das medicamentos constitui o maior problema da saúde pública. Especialmente nos países em desenvolvimento onde há falta de recursos adequados para efectivamente controlar esses problemas.

O uso de Sulfadoxina e Pirimetamina fora do prazo ou falsificados retarda o tratamento quimioterapêutico da malária. É com essas considerações que nesse trabalho se descreve um simples, rápido, barato e sensível método colorimétrico de autenticação desses antimaláricos.

A Sulfadoxina e Pirimetamina foram isolados a partir do Fansidar injectável usando as suas solubilidades, sendo a Sulfadoxina solúvel em água e a Pirimetamina insolúvel.

Depois seguiu a purificação e a análise dos pontos de fusão de cada composto, tendo-se obtido cerca de 198-201 °C para a Sulfadoxina e 240-243 °C para a Pirimetamina que são valores muito próximos aos dados da literatura ^[13, 28, 38, 44].

A análise da pureza foi feita usando a Cromatografia em Camada Fina (CCF)

A confirmação das estruturas foi feita usando os espectros de Infravermelho e os espectros de massa, tendo-se obtido bandas que correspondem aos compostos desejados (Sulfadoxina e Pirimetamina).

A Sulfadoxina e a Pirimetamina absorvem quase na mesma região (200-400 nm para Pirimetamina e 230-350 nm para a Sulfadoxina), sendo impossível a determinação simultânea em formulações farmacêuticas sem antes separar ^[13, 14].

Neste estudo fez-se a análise simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina usando a reacção de complexação com o ácido Cloranílico como agente complexante e 1,4- Dioxano como solvente.

Primeiro investigou-se o máximo de absorção para cada complexo e para o complexante, tendo-se obtido 500 nm para o complexo de Sulfadoxina, 520 nm para o complexo de Pirimetamina e 420 nm para o ácido Cloranílico, O que mostra que é possível a determinação simultânea desses dois compostos, mas sob a forma de complexos pois esses absorvem em regiões diferentes.

Os limites de detecção foram de 3.22×10^{-5} mol/L para a Sulfadoxina e 2.01×10^{-5} mol/L para a Pirimetamina.

Usando o método de complexação obtivemos um rendimento de cerca de $98.04 \pm$ RSD 2.00% até $103.03 \pm 2.94\%$ para Sulfadoxina e $95.33 \pm$ RSD 4.90% até $99.5 \pm 2.5\%$ para Pirimetamina.

Pode-se recomendar esta técnica desenvolvida pós a sua sensibilidade, exactidão e simplicidade dão-nos resultados fieis na garantia de qualidade e análise de estabilidade dessas drogas.

INDICE

Capítulos	Títulos	Páginas
	Dedicatória	i
	Agradecimentos especiais	ii
	Agradecimentos	iii
	Declaração de Honra	iv
	Resumo	vi
	Abreviaturas	vii
1	INTRODUÇÃO	1
2	LEVANTAMENTO DO PROBLEMA	3
3	JUSTIFICATIVA	4
4	OBJECTIVOS	4
	4.1 Objectivos gerais	
	4.2 Objectivos específicos	
5	METODOLOGIA	5
6	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
	6.1. A malária	6
	6.2. Fármacos antimaláricos	7
	6.3. O Fansidar	8
	6.3.1. Resistência da malária ao Fansidar.....	9
	6.4. Sulfadoxina	9
	6.5. Pirimetamina	11

Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar

6.6.	Descrição das técnicas usadas para a análise	12
6.6.1.	Espectrofotometria de Ultra violeta e Visível (UV/VIS).....	12
6.6.2.	Espectrofotometria de Infravermelho (IV).....	13
6.6.3.	Espectrofotometria de massa (MS).....	14
6.6.4.	Cromatografia em Coluna (CC).....	14
6.6.5.	Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	15
6.7.	Exemplos de análises de Sulfadoxina e Pirimetamina.....	16
6.7.1	Determinação da Sulfadoxina usando espectrofotometria de UV/Vis.....	16
6.7.2	Análise quantitativa simultânea de antimaláricos Pirimetamina e Sulfametoxipirazina em amostras de plasma usando HPLC.....	17
6.7.3	Determinação simultânea de Pirimetamina, Sulfadiazina e N-acetil-Sulfadiazina no plasma usando HPLC.....	18
6.7.4.	Determinação espectrofotométrica de Cloroquina e Pirimetamina por formação de pares iônicos com Molibdênio e Tiocianato.....	18
6.7.5.	Uso da refractometria e colorimetria para a avaliação rápida da qualidade de drogas antimaláricas.....	19
6.8	Base teórica para a determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina.....	20
7	PARTE EXPERIMENTAL	22
7.1.	Procedimentos gerais.....	22
7.1.1.	Isolamento e purificação de Sulfadoxina e Pirimetamina.....	22
7.1.1.1.	Isolamento.....	22
7.1.1.2.	Purificação	24
a)	Sulfadoxina.....	24
b)	Pirimetamina.....	24

Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar

7.1.1.3.	Purificação usando cromatografia de distribuição em coluna.....	25
7.1.1.3.1.	Resultados Obtidos.....	26
7.1.1.3.2.	Análise dos resultados	27
7.1.1.4.	Confirmação da Pureza usando Cromatografia em Camada fina.....	27
	Análise dos resultados.....	30
7.1.1.5.	Confirmação da estrutura usando Espectrofotometria de Infravermelho e espectrofotometria de massa.....	31
7.1.1.5.1.	Interpretação do espectro de infravermelho da Pirimetamina.....	31
7.1.1.5.2.	Interpretação do espectro de massa da Pirimetamina.....	33
7.1.1.5.4.	Interpretação do espectro de infravermelho da Sulfadoxina.....	34
7.1.2.	Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar.....	36
	Ácido Cloranílico.....	36
	1,4-Dioxano.....	37
7.1.2.1.	Determinação da absorção máxima para ácido Cloranílico e seus complexos com Sulfadoxina e Pirimetamina.....	37
	Análise dos resultados.....	40
7.1.2.2.	Construção da curva de calibração.....	40
7.1.2.3.	Determinação simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina.....	43
7.1.2.3.1	Determinação das concentrações de Sulfadoxina e Pirimetamina nas amostras.....	45
7.2.	ANÁLISE DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	46

7.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
8 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	50
8.1. Conclusões.....	50
8.2. Recomendações.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	57
Anexo 1: Tratamento estatístico dos dados	
1.1. Para os dados das curvas de calibração.....	I
1.1.1. Sulfadoxina.....	I
1.1.2. Pirimetamina.....	II
1.2. Para a análise espectrofotométrica das amostras de Fansidar.....	IV
1.2.1. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra A.....	IV
1.2.2. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra A.....	IV
1.2.3. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra B.....	V
1.2.4. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra B.....	V
1.2.5. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra C.....	VI
1.2.6. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra C.....	VI
Anexo 2: TLC de Sulfadoxina, Pirimetamina e Fansidar.....	
{Š.....	VII
Anexo 3: Anexo de espectros.....	
Anexo 3.1: Espectro de Infravermelho da Pirimetamina.....	VIII

Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar

Anexo 3.2: Espectro de Massa da Pirimetamina.....	IX
Anexo 3.3: Espectro de Infravermelho da Sulfadoxina.....	X
Anexo 4: Anexo de figuras	
4.1. Distribuição da malária no mundo.....	XI
4.2. Aspecto de alguns glóbulos vermelhos após a acção do <i>plasmodium</i>	XI
4.3 O mosquito do género Anopheles	XII
4.4 Ciclo de vida do parasita e local de acção dos agentes antimaláricos.	XII
4.5. Espécies de Plasmodium causadores da malária.....	XIII

- ÍNDICE DE TABELAS -

Tabela 1: Características da Sulfadoxina.....	9
Tabela 2: Características da Pirimetamina.....	11
Tabela 3: Resultados do isolamento da Sulfadoxina.....	23
Tabela 4: Resultados do isolamento da Pirimetamina.....	23
Tabela 5: Análise das fracções obtidas durante a CC por TLC.....	26
Tabela 6: Valores de Rf obtidos na experiência e tabelados.....	29
Tabela 7: Análise da Pirimetamina por espectrofotometria de IV.....	31
Tabela 8: Análise da Pirimetamina por espectrofotometria de massa.....	33
Tabela 9: Análise da Sulfadoxina por espectrofotometria de IV.....	34
Tabela 10: Propriedades do Ácido cloranílico	36
Tabela 11: Dados usados na preparação das soluções de análise do $\lambda_{\text{máx}}$	38
Tabela 12: Leitura das absorvâncias do ácido Cloranílico em triplicado.....	38
Tabela 13: Coloração da solução dos complexos de Sulfadoxina e Pirimetamina.....	39
Tabela 14: Leitura das absorvâncias do complexo de Sulfadoxina em triplicado.....	39
Tabela 15: Leitura das absorvâncias do complexo de Pirimetamina em triplicado.....	39
Tabela 16: Dados necessários para a preparação das soluções.....	41
Tabela 17: Absorvâncias de complexos Sulfadoxina e Pirimetamina.....	41

Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar

Tabela 18: Dados necessários para a preparação das soluções.....	43
Tabela 19: Absorvâncias do complexo A para a determinação simultânea.....	44
Tabela 20: Absorvâncias do complexo B para a determinação simultânea.....	44
Tabela 21: Absorvâncias do complexo C para a determinação simultânea.....	44
Tabela 22: Cálculos das concentrações de Sulfadoxina e Pirimetamina em cada marca.....	45
Tabela 23: Cálculo das quantidades em massa de 1 mL das soluções preparadas.....	45
Tabela 24: Massa total da Sulfadoxina e Pirimetamina em cada comprimido e seus rendimentos.....	46
Tabela 25: Análise das curvas de calibração.....	46

- ÍNDICE DE FIGURAS -

Figura 1: Estruturas dos fármacos antimaláricos do grupo dos antifolatos.....	7
Figura 2: Absorção máxima para ácido Cloranílico, Sulfadoxina e Pirimetamina.....	40
Figura 3: Curva de calibração para o complexo de Sulfadoxina.....	42
Figura 4: Curva de calibração para o complexo de Pirimetamina.....	42

Abreviaturas

LNCQM: Laboratório Nacional de Controlo de Qualidade dos Medicamentos

P.: Plasmodium

TLC: Cromatografia em camada fina

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

CC: Cromatografia em coluna

Ác.: Ácido

A: Absorvância

λ : Comprimento de Onda

RSD: Desvio padrão relativo

1 Introdução

A malária ou o paludismo é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crónica, com manifestações episódicas de carácter agudo e períodos de latência que podem simular cura ^[2,11].

A malária é causada por um parasita protozoário unicelular do género *Plasmodium*. Das 4 espécies (*P. Falciparum*, *P. Malariae*, *P. Ovale* e *P. Vivax* ^[7]), o *P. Falciparum* e o *P. Vivax* são responsáveis por cerca de 95% do total dos casos de malária em todo mundo ^[2].

Todas as espécies do *plasmodium* têm dois hospedeiros: um vertebrado e o mosquito, o qual age como corpo vector e hospedeiro ^[23].

O mosquito vector da malária é do género *anopheles* (Anexo 4.3) e o organismo do *plasmodium* requer o Homem e o mosquito para completar o seu ciclo de vida ^[23].

A malária manifesta-se por ataques de febres acompanhados por severas dores de cabeça, arrepios, náuseas, algum delírio, vómitos e dores gástricas ^[23].

Desde o início as febres maláricas foram a grande preocupação das nossas sociedades e com isso foi se tentando o uso de drogas antipiréticas ^[23].

Na década de 1950, grande parte das tentativas de erradicar este flagelo falhou, principalmente, devido ao desenvolvimento da resistência aos agentes antimaláricos ^[43].

Desde 1960, a transmissão da malária aumentou em muitas regiões onde a infecção é endémica. Cepas de *P. Falciparum* resistentes à cloroquina e à múltiplos agentes disseminaram-se e o grau de resistência medicamentosa aumentou ^[43].

A completa irradicação do mosquito, que é o transportador do *plasmodium*, ainda não foi possível. Por conseguinte, a procura de novas drogas antimaláricas potentes vem sendo levada a cabo em todo mundo ^[24].

Em 1967 começou o uso do **Fansidar** que é uma combinação de *Sulfadoxina* (500mg) e *Pirimetamina* (25 mg) que inibe os passos subsequentes envolvidos na biossíntese do ácido tetraidrofólico ^[13,21,46]. Este reage com o ácido fólico, um cofactor essencial na biossíntese de ácidos nucleicos, resultando numa interferência com o ácido nucleico do protozoário e produção de proteínas ^[46].

A Sulfadoxina e Pirimetamina continuam a despertar interesse para os analistas, devido, a sua grande posição na quimioterapia da malária ^[9]. Essas drogas reagem com o ácido Cloranílico dando compostos de coloração muito intensa denominados complexos e a qualidade da droga depende da estabilidade desses complexos ^[9].

2. Levantamento do problema

A proliferação da baixa qualidade e a falsificação de drogas constituem o maior problema da saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento onde há falta de recursos adequados para efectivamente ultrapassarem esses problemas.

A Pirimetamina e a Sulfadoxina são agentes antimaláricos muito importantes que contêm grupos *amina*. A sua análise continua a ser de grande importância devido à elevada posição na quimioterapia da malária.

Na literatura é possível encontrar informação acerca das análises farmacêuticas de Sulfadoxina (*N'*- (5,6-dimetoxipirimidin-4-il) Sulfanilamida) e Pirimetamina (2,4-diamino-5(*p*-Clorofenil)-6-etilpirimidina) usando métodos clássicos de análise, como a detecção ou quantificação das drogas no sangue, na urina ou no plasma usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Porém, na literatura corrente há pouca informação envolvendo a interacção entre um π -receptor como o ácido clorânico com Sulfadoxina e Pirimetamina (π -dadores), que é o método que descrevemos para a obtenção de complexos estáveis e para a determinação quantitativa simultânea dessas drogas.

As vantagens do uso da determinação simultânea por complexação são:

- O facto da amostra ser preparada duma só vez;
- condições de análise estáveis
- Redução do erro de análise.

3. Justificativa

O uso da Sulfadoxina e da Pirimetamina de baixa qualidade ou falsificados retarda o tratamento quimioterapêutico da malária. Nos Países subdesenvolvidos a falta de fundos e de instrumentos analíticos de alta tecnologia e a igual indisponibilidade de muitos reagentes recomendados em compêndios oficiais leva-nos a desenvolver métodos alternativos e sensitivos de análise dessas drogas. É com essas considerações que neste trabalho propõe-se um método colorimétrico simples, rápido e barato de autenticação desses antimaláricos simultaneamente.

4. Objectivos do trabalho

4.1. Objectivos gerais

- Propor um método simples, rápido, barato e sensitivo para a determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar.

4.2. Objectivos específicos

- Obtenção de Sulfadoxina e Pirimetamina e sua purificação usando Cromatografia em coluna e controle de pureza por TLC
- Confirmação das estruturas de Sulfadoxina e Pirimetamina usando espectrofotometria de IV e espectrofotometria de Massa
- Determinação da absorção máxima para o ácido Cloranílico e seus complexos com Sulfadoxina e Pirimetamina.
- Construção das curvas de calibração e determinação quantitativa de Sulfadoxina e Pirimetamina em três amostras de Fansidar de diferentes fabricantes.

5. Metodologia aplicada

- Pesquisa bibliográfica
- Colheita das amostras
- Isolamento, purificação e identificação da Sulfadoxina e Pirimetamina a partir do Fansidar na forma injectável
- Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina com o ácido Cloranílico
- Análise dos resultados e tratamento estatístico de dados
- Elaboração e entrega do relatório final

6. Revisão bibliográfica

6.1. A malária

A malária continua a ser a infecção humana mais devastadora no mundo inteiro com 300 a 500 milhões de casos clínicos e quase 3 milhões de mortes por ano ^[43].

Na África, a situação é alarmante: cerca de 500 mil novos casos são diagnosticados em crianças anualmente e, destes, 10-20% vão a óbito e 7% permanecem com sequelas neurológicas ^[51]. A maioria destas mortes é causada pelo *P. Falciparum*, cujo maior risco é para pessoas não imunes e crianças menores de 5 anos ^[43].

As principais áreas afectadas pela malária são a África Tropical, a região Amazónica, o Sudoeste Asiático e a Oceânia, como mostra a *Anexo 4.1*. Esta doença atinge principalmente crianças, mulheres grávidas e adultos não-imunes, entre eles, trabalhadores rurais, refugiados e turistas ^[3].

Em Moçambique, a malária é uma doença endémica, variando entre áreas meso-endémicas e hiper-endémicas. No País cerca de 48% de todas consultas externas e cerca de 63% de todas admissões pediátricas nos hospitais rurais e centrais foi atribuída a malária ^[2].

O parasita mais perigoso é o *P. Falciparum* que encontra-se presente na África, na Amazônia, no Sudoeste asiático e na Oceânia ^[27]. Este aniquila os glóbulos vermelhos do sangue, provocando estados anémicos (*Anexo 4.2*).

Estes parasitas têm um ciclo de vida complicado (*Anexo 4.4*) que sofre várias fases de desenvolvimento tanto no mosquito como no Homem ^[5].

6.2. Fármacos antimaláricos

Os fármacos usados para o tratamento e prevenção da malária são designados por fármacos antimaláricos ^[5, 45]. Estas drogas actuam nos diferentes estágios do ciclo de vida do *Plasmodium* (Anexo 4.4) e são classificadas em diferentes classes, tais como ^[43]:

- 4-aminoquinolinas;
- Álcoois arílicos, incluindo quinolinometanois;
- Compostos antifolatos;
- Derivados da artemisinina.

Os componentes do *Fansidar* (*Sulfadoxina e Pirimetamina*) fazem parte da classe dos compostos antifolatos. Estes (figura 1) inibem a síntese das bases pirimidínicas do parasita e, conseqüentemente, a síntese do DNA. Existem dois grupos dos antifolatos: inibidores do dihidrofolato redutase (DHFR), *Pirimetamina e Proguanil*, por exemplo, e inibidores da dihidrofolatos sintetase (DHPS), que são sulfonas e sulfonamidas, como por exemplo, a *Dapsona e Sulfadoxina*, respectivamente ^[11, 16].

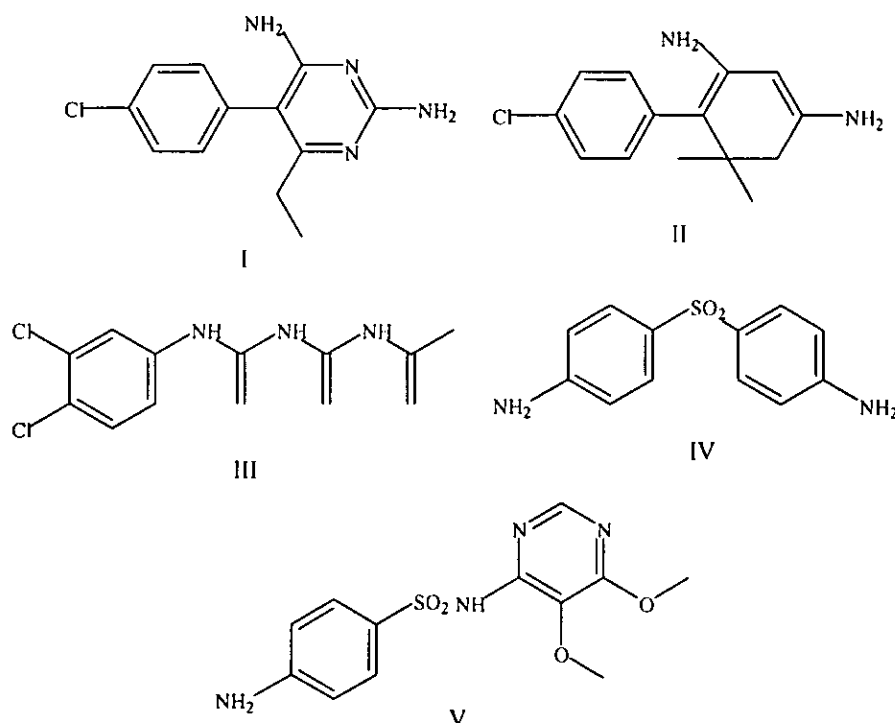


Figura 1: Estruturas dos fármacos antimaláricos do grupo dos antifolatos ^[5, 11, 16].

Onde:

I. Pirimetamina

IV. Dapsona

II. Cicloguanil

V. Sulfadoxina

III. Cloroproguanil

6.3. O Fansidar

O Fansidar (*Sulfadoxina 500 mg + Pirimetamina 25 mg*) actua sobre os agentes causadores da malária, graças à potencialização recíproca dos seus dois componentes ^[19]. Devido à esta marcante acção sinérgica, as formas erotrócíticas assexuadas dos parasitas da malária (trofozoítos e esquizontes) são eliminadas com uma única dose. Este efeito é possível graças ao bloqueio das duas enzimas envolvidas na biossíntese do ácido folínico dos parasitas ^[12, 20, 46].

Este medicamento pode-se encontrar sob a forma de comprimidos e solução injectável de 2.5 mL (ambos contendo 500 mg de Sulfadoxina e 25 mg de Pirimetamina).

Os comprimidos contém, para além dos princípios activos, *amido, lactose, gelatina, talco e estearato de magnésio* e a solução injectável (ampolas) contém, para além dos princípios activos *água destilada, etanol, álcool benzílico, Hidróxido de Sódio e propilenoglicol* ^[21, 46].

A **Pirimetamina** e **Sulfadoxina** actuam no bloqueio da produção do ácido folínico dentro do parasita. O ácido folínico é essencial na produção de material genético novo (o DNA) que é necessário na reprodução do parasita e com isso, impede a multiplicação do parasita dentro do indivíduo ^[10, 45, 47].

O Fansidar (*Sulfadoxina 500 mg + Pirimetamina 25 mg*) pode ser associado à quinina e à mefloquina assim como à antibióticos. Não possui efeito hipoglicémico e por isso não influencia a acção dos medicamentos antidiabéticos ^[47].

6.3.1. Resistência da malária ao Fansidar (Sulfadoxina + Pirimetamina)

O Fansidar (Sulfadoxina + Pirimetamina) é eficaz contra todos os plasmódios patogénicos humanos (*anexos 4.5*) (*P. Falciparum*, *P. Vivax*, *P. Ovale*, *P. malariae*) e também contra cepas resistentes a agentes antimaláricos, como à Cloroquina e outras 4-aminoquinolinas ou à Pirimetamina ^[13, 20, 47].

A combinação Sulfadoxina – Pirimetamina foi introduzida para o tratamento de *P. Falciparum* de um modo globalizado durante os anos 60. Rapidamente, no entanto, surgiram os primeiros casos publicados de resistência na fronteira da Tailândia – Camboja ^[9].

6.4. Sulfadoxina

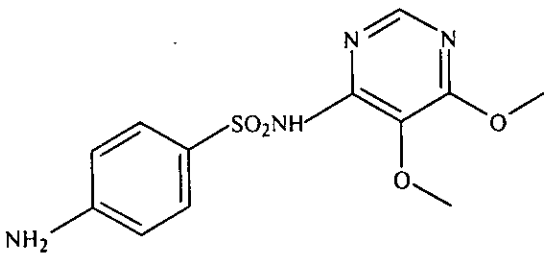
A Sulfadoxina, é uma sulfonamida muito activa de acção prolongada (tempo de acção de 17 a 40 horas) análogo estrutural do ácido p-aminobenzóico e competetivamente, inibe a enzima dihidrofolato sintetase ^[10, 45, 47].

Em associação com Pirimetamina a Sulfadoxina (Tabela 1) é usada no tratamento e na profilaxia da malária resistente a outras terapias ^[15].

A Sulfadoxina pode ser caracterizada de acordo com a tabela que se segue:

Tabela 1: Características da Sulfadoxina ^[14, 26, 32]

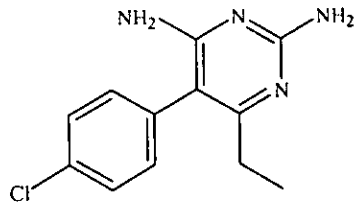
Sulfadoxina	
Definição	A Sulfadoxina contém no mínimo 99.0% e no máximo, o equivalente a 101.0% de 4-amino-N-(5,6-dimetoxipirimidin-4-il) benzenosulfonamida, calculado em relação à substância seca.

Fórmula estrutural	
Outros nomes	Sulformetoxi; Sulfortomidina; Sulfadimetoxina Sulfoetomidina ; Sulfortodimetoxina
Nome químico	N' - (5,6-dimetoxi-4-pirimidinil) Sulfanilamida
Nomes comuns.	Fanasil ; Fanaril; Fanasulf ; Fanzil; Fontasul.
Número CAS	2447-57-6
Fórmula molecular ; massa molar	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S; 310.33 g/mol
Composição elementar	C46.44%; H4.55%; N18.05% : O20.62%; S10.33%
Aparência, cor e cheiro	É um pó cristalino, branco ou creme esbranquiçado sem cheiro.
Ponto de fusão	Funde no intervalo de 197 a 200 °C com decomposição.
Solubilidade.	É pouco solúvel em água; pouco solúvel em álcool e em metanol; praticamente insolúvel em éter; solúvel em ácidos minerais diluídos e em soluções de alcali de metais e carbonatos.
Espectros de UV.	Absorve de 230 a 350 nm em meio ácido. Exibe-se um máximo, só nos 267 nm e à absorvância é de cerca de 1.1.
Espectros de IV	Exibe os picos principais nas seguintes frequências: 1583, 1161, 1596, 1315, 1091 e 1305 cm ⁻¹ em discos de KBr

6.5. Pirimetamina

A Pirimetamina é um inibidor competitivo da enzima hidrofolato redutase ^[13].

Tabela 2: Características da Pirimetamina ^[11, 13, 28, 39, 45, 47, 50].

Pirimetamina	
Definição	A Pirimetamina (figura 1) contém, no mínimo, 99.0%, e no máximo, o equivalente à 101.0% de 2,4-diamino-5-(4-Clorofenil)-6-etilpirimidina, calculado em relação à substância seca.
Fórmula Estrutural	
Outros nomes	BW 50-63; RP 4753; Pirimetamínio
Nome químico	5-(4-Clorofenil)-6-etil-2,4-pirimidinodiamina; 2,4-Diamino-5-(p-Clorofenil)-6-etilpirimidina; 5-(4-Clorofenil)-6-etilpirimidino-2,4-diamino.
Nomes usuais	Daraprim; Cloridina; Malocida; Supacox; Maloprim (com Dapsona)
Fórmula molecular; massa molar	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₄ ; 248.71 g/mol
Composição elementar	C57.94%; H5.27%; N22.53%; Cl 14.25%.
Aparência, cor e cheiro	É um pó cristalino quase branco ou cristais incolores, sem cheiro e sem sabor.
Pontos de fusão	233-234 °C; 240-242 °C, 239-242 °C; 235-236 °C; 237-238 °C

Solubilidade	Praticamente insolúvel em água; Muito pouco solúvel em etanol (cerca de 9 mg/L); Muito pouco solúvel em HCl diluído (cerca de 5 mg/L); Muito pouco solúvel em acetona e em Clorofórmio (1 mg/125ml); solúvel em propilenoglicol e N,N-dimetilacetamida a 70 °C; Solúvel em etanol em ebulição (25 mg/L); Solúvel em ácidos minerais com aquecimento.
Espectros de UV	Em soluções aquosas ácidas:200-400 nm; Na solução de 0,005N HCl exibe um máximo de 272nm e um mínimo de 260nm.
Espectros de IV	Tem uma absorção de 3440-750 cm ⁻¹ , apresentando os picos principais nas frequências 1628, 1575, 1640, 1075, 835, 805 cm ⁻¹
Espectros de massa	Apresenta os principais picos a 247, 248, 249, 250, 219, 212, 106, 221

6.6. Descrição das técnicas usadas para a análise de Sulfadoxina e Pirimetamina

6.6.1. Espectrofotometria de Ultra violeta e Visível (UV/VIS)

É a espectrofotometria de absorção molecular na zona do espectro electromagnético ultravioleta e visível (200-750 nm)^[10].

Quando uma radiação incide sobre o meio homogéneo, uma parte é absorvida e a outra é transmitida. Se não houver uma absorção total, este método baseia-se na absorção da radiação por moléculas^[10].

O termo mais importante a se determinar na espectrofotometria de UV/VIS é a absorvância *A* da solução que é definida como sendo o logaritmo decimal do inverso da transmitância *T* para uma radiação monocromática^[10]. Esta exprime-se por:

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(I_0/I) \quad (1)$$

Onde:

$$T = I/I_0$$

I_0 = Intensidade da luz monocromática incidente

I = Intensidade da luz monocromática transmitida

Na ausência de outros factores físico-químicos, a absorvância medida (A) é proporcional a espessura (b) da camada atravessada e à concentração dissolvida ^[10], de acordo com a equação seguinte:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (2)$$

Onde:

ϵ = Absortividade molar (onde b é expresso em centímetros e c em moles/ litro).

Os espectrofotómetros utilizados para o estudo nas regiões Ultravioleta e Visível são constituídos por um sistema óptico susceptível de fornecer luz monocromática na região de 200 a 750 nm e por um dispositivo apropriado para a medição das absorvâncias ^[10].

6.6.2. Espectrofotometria de Infravermelho (IV)

Os espectrofotómetros destinados ao registo de espectros na região espectral do infravermelho consistem num sistema óptico capaz de fornecer uma radiação aproximadamente monocromática na região de 4000 cm^{-1} a 670 cm^{-1} ou, em alguns casos, até 200 cm^{-1} e por um dispositivo permitindo a leitura da relação entre as intensidades da radiação transmitida e da radiação incidente ^[10].

6.6.3. *Espectrofotometria de massa (MS)*

No espectrómetro de massa as moléculas são bombardeadas com um feixe de electrões de alta energia. As moléculas ionizam-se e cindem-se em muitos fragmentos, alguns dos quais são iões positivos. Cada espécie de iões possui determinado valor da razão da massa para a carga, ou o valor m/e . Como na maioria dos iões, a carga é 1, m/e é simplesmente a massa do ião ^[29].

Analisa-se o conjunto de iões por forma a obter-se um sinal para cada valor m/e que estiver representado; a intensidade de cada sinal traduz a abundância relativa do ião que o produz. O pico mais intenso chama-se *pico de base*; as intensidades dos vários picos exprimem-se numa escala relativa, em que se dá o valor 100 à do pico de base ^[29].

Chama-se *espectro de massa* ao gráfico - ou mesmo tabela - em que se mostrem as intensidades relativas dos sinais correspondentes aos vários valores de m/e ; é uma característica altamente individualizada dos compostos ^[29].

6.6.4. *Cromatografia em Coluna (CC)*

A cromatografia em coluna é geralmente utilizada na separação ou purificação de substâncias orgânicas. A técnica requer uso de tubos de vidro, montados verticalmente, contendo o suporte sólido finamente dividido (fase estacionária), em geral sílica gel ou óxido de alumínio. A substância que se deseja purificar é aplicada no topo da coluna e a eluição da substância efectuada mediante a adição do solvente adequado. Na parte inferior da coluna recolhe-se um número de fracções, nas quais se encontram os componentes da mistura separados ^[10, 28].

A velocidade com que uma substância trafega pela coluna depende da sua polaridade, da polaridade da fase estacionária e da polaridade do solvente (eluente). Se o composto é mais atraído pela fase estacionária do que o solvente, ele migrará lentamente. Se a sua

afinidade for maior pelo solvente, ele migrará mais rapidamente, gastando menos tempo e solvente ^[10, 28].

O êxito de uma cromatografia em coluna dependerá então da escolha do suporte e solvente adequados. Em alguns casos é possível visualizar a separação dos componentes de uma mistura observando o desenvolvimento de faixas diferentes na coluna ou iluminando-se com luz ultravioleta. Entretanto, na maioria das vezes, torna-se necessário acompanhar a separação dos componentes examinando cada fracção eluída por CCF ^[10, 28].

6.6.5. Cromatografia em Camada Fina (CCF ou a sigla inglesa TLC)

A Cromatografia em Camada Fina ou delgada (CCF ou CCD) é uma técnica de fácil execução, rotineiramente usada no laboratório de química orgânica. Amostras muito pequenas (1-100 µg) podem ser rapidamente analisadas ^[28].

Devido a conveniência e rapidez usa-se a técnica para ^[28]:

- Estabelecer se dois compostos são idênticos;
- Verificar a pureza de um composto;
- Determinar o número de componentes em uma mistura;
- Determinar o solvente apropriado para a separação em uma coluna cromatográfica;
- Monitorar a separação de uma mistura em uma coluna cromatográfica;
- Acompanhar o progresso de uma reacção.

A técnica consiste em aplicar uma camada fina do adsorvente finamente pulverizado (geralmente sílica ou óxido de Alumínio, às vezes adicionados de material fluorescente à luz ultravioleta) sobre uma placa lisa e plana (vidro ou alumínio). O adsorvente é fixado á placa por adição de gesso ou álcool poli-vinílico. Alguns microlitros de solução da amostra a ser examinada são aplicados próximos a uma das bordas da placa, e a mesma

imersa alguns milímetros em um eluente mantido em recipiente fechado. O eluente, por força da capilaridade, percorre a fase fixa em movimento ascendente, carregando consigo os componentes da amostra. Diferentes compostos ascendem a diferentes alturas dependendo das suas estruturas moleculares ^[28].

Quando as condições são completamente especificadas é possível identificar uma substância pelo seu valor de Rf. Define-se o Rf como a razão entre a distância percorrida na placa pela substância e a distância percorrida pelo solvente (medidas no centro da mancha da substância e a frente do solvente) ^[28].

$$Rf = \frac{D2}{D1} \text{ [28]}$$

Onde: D2 = Distância percorrida pela mancha desde a origem

D1 = Distância percorrida pelo solvente desde a origem

6.7. Exemplos de análises de Sulfadoxina e Pirimetamina

6.7.1 Determinação da Sulfadoxina usando espectrofotometria de UV ^[10, 14]

A Sulfadoxina pode ser determinada por espectrofotometria de UV em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos, tendo ela já sido determinada espectrofotometricamente no Fansidar injetável e xarope a 220-320 nm. A Sulfadoxina pode também ser determinada na presença de Cloroquina, Quinina e Pirimetamina na urina e no sangue, fazendo-se a extração da Cloroquina, Quinina e Pirimetamina com o éter dietílico.

6.7.2 Análise quantitativa simultânea de antimaláricos Pirimetamina e Sulfametoxipirazina em amostras de plasma usando HPLC ^[42]

Vários métodos de análise de drogas envolvendo a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) já foram descritos, alguns deles usam a detecção com o espectrómetro de massa para a análise individual de Pirimetamina e Sulfametoxipirazina, mas nenhum deles para a determinação simultânea de ambas drogas

Para a Análise quantitativa simultânea de Pirimetamina e Sulfametoxipirazina são necessárias duas fases móveis, sendo a primeira constituída por de ácido fórmico - água 0.2:100 (v/v) e ácido fórmico - água - acetonitrilo 0.2:120:80 (v/v). Ambos solventes são inicialmente filtrados em uma membrana de filtro com uma espessura de 0.45 µm.

A cromatografia líquida é feita usando uma coluna de Hypersil BDS fenil com um comprimento de 100 mm. O sistema cromatográfico consiste de um aparelho de marca Hewlett Packard (HP) Agilent 1100, sendo os capilares equipados por um sistema de auto amostragem com uma injeção contendo uma fenda de 100 µL.

O sistema HPLC é conectado por meio de interfases com um sistema Waters Quattro Ultima triple quadrupole (um sistema de micromassa-Líquido), equipado por um electropulverizador de ionização (ESI) que opera sobre os iões positivos. O espectrómetro de massa opera de um modo que é possível monitorar as reacções múltiplas, permitindo uma sensibilidade máxima e uma boa especificidade. O Nitrogénio actua como nebulizador (60 L/h) e também como gás de secagem (580L/h) e o árgon serve como gás de colisão. Os dados foram colectados e processados usando os softwares Masslynx e Quanlynx.

6.7.3 Determinação simultânea de Pirimetamina, Sulfadiazina e N-acetil-Sulfadiazina no plasma ^[22]

No artigo [22] se descreve o método para a determinação simultânea de Pirimetamina, Sulfadiazina e do seu maior metabolito o N-acetil-Sulfadiazina. O método envolve uma simples preparação da amostra usando somente 25µL de plasma e a medição é baseada no uso do HPLC acoplado a um detector contendo um díodo de arraste (DAD) e um espectrómetro de massa (MS). Esta técnica tem uma alta sensibilidade, a qual concede elevada selectividade. Os iões são monitorados através do uso de padrões internos.

A aplicabilidade do método é demonstrada pelo monitoramento de concentrações do anólito no plasma de 9 crianças em tratamento de toxoplasmosi congénita por um período de 10 semanas.

Esta técnica é feita com o uso de um aparelho HPLC 1100 equipado por um detector contendo um díodo (que opera a 269 nm). O espectrómetro de massa opera de um modo de electropulverização positiva com o monitoramento individual dos iões a 249.1 de massa unitária de Pirimetamina, 251.1 de massa unitária para a Sulfadiazina, 249.1 de massa unitária para a Sulfametoxazole e 293.1 de massa unitária para N-acetil-Sulfadiazina.

6.7.4 Determinação espectrofotométrica de Cloroquina e Pirimetamina por formação de pares iónicos com Molibdénio e Tiocianato ^[24]

A solução de Cloroquina (80 µL/mL) deve ser preparada na hora da análise por dissolução da Cloroquina em água bidistilada. A Pirimetamina dissolve-se em etanol e depois as soluções são deixadas a uma temperatura de 4 °C, num recipiente de PVC em um refrigerador. A solução Stock de Molibdénio (VI) 2% w/v foi preparada a partir do molibdato de amónia em água bidistilada contendo algumas gotas de Hidróxido de

amónia e padronizada gravimetricamente usando 8-hidroxiquinolina. A solução trabalho é preparada por diluição apropriada da solução Stock padronizada.

As soluções de Tiocianato de amónia e Ácido Ascórbico (10% cada um) são preparadas em água bidistilada.

Para a análise é usado um espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 601 com cuvetas de quartzo de 1.0 cm de espessura em Comprimento de Onda que abrange de 350-600 nm ^[24].

O método envolve a formação de pares iónicos entre as duas drogas em investigação e os complexos inorgânicos de molibdénio (V) – Tiocianato seguido pela sua extracção com o Cloreto de metileno. As condições óptimas para a formação dos pares iónicos são estáveis. O método permite a determinação de Cloroquina e Pirimetamina numa concentração de 2,0 à 42,0 e 2,0 à 43,0 µg/mL, respectivamente. A sensibilidade do aparelho é de 0.027 e 0.042 µg/cm³ para Cloroquina e Pirimetamina, respectivamente. O método é simples, rápido, com uma boa reproducibilidade e exactidão de ±1% ^[24].

6.7.5 Uso da refractometria e colorimetria para a avaliação rápida da qualidade de drogas antimaláricas

Nesta análise usa-se a refractometria, colorimetria e uma técnica que combina os dois processos como um simples e preciso método para rapidamente testar a qualidade de medicamentos antimaláricos comercializados Artesunato, Sulfadoxina, Quinina e Cloroquina ^[19].

O objectivo desse estudo é avaliar o uso das duas técnicas, refractometria e colorimetria em separado ou combinadas para rapidamente assegurar a qualidade de Cloroquina injectável e em comprimidos revestidos, Quinina em cápsulas, Sulfadoxina e Pirimetamina em comprimidos e Artesunato em comprimidos ^[19].

Os testes colorimétricos aqui descritos, foram adaptados para serem usados como auxílio aos métodos de índice refractivo.

São preparados extractos dos ingredientes activos a partir dos comprimidos ou das soluções injectáveis e esses extractos são sujeitos a medição dos seus índices refractivos e a respectiva análise colorimétrica. Os resultados são comparados usando a análise por HPLC ¹⁹⁾.

6.8 Base teórica para a determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina

Todas as moléculas quando em contacto uma com as outras, de alguma forma criam interacções como se fosse algum tipo de força intermolecular. Estas forças podem ser pequenas quando comparados com forças intramoleculares (que ocorrem no interior da molécula) ¹⁵⁾. Os compostos com pares de electrões não compartilhados podem interagir com outros compostos através da doação de alguns electrões numa maneira diferente da tradicional formação da ligação dativa ^{15,33)}. Dependendo da molécula que aceita esses electrões essa forma de interacção pode ser chamada π -doadores e claro os receptores também devem ser descritos como π -receptores ^{15,30)}.

Os π - receptores são constituídos pela maioria dos compostos orgânicos, incluindo os sistemas insaturados como núcleos aromáticos e heteroaromáticos contendo electrões com grupos retiradores, como é o caso de *nitro, ciano, haletos e quinonas* ^{15,30)}.

Estudos têm sido levado a cabo nos quais os π - receptores foram utilizados como agentes pulverizantes na placa de TLC para detecção de misturas contendo moléculas com electrões dadores ¹¹⁾. Interacções com transferência de carga têm também sido desenvolvidas para a determinação quantitativa de compostos carbonilos depois da derivatização ¹⁷⁾.

O fenómeno das interacções dador-receptor entre as moléculas orgânicas já foi aplicado com sucesso na análise dos produtos farmacêuticos ^[21, 31, 37]. Essas interacções geralmente dão-nos complexos de cor muito intensa que absorvem a radiação na região do visível do espectro electromagnético ^[15, 30].

Em vários casos esses complexos existem somente em forma de solução em equilíbrio com a componente molecular e a estabilidade desses complexos determina a qualidade para fins analíticos^[15, 30].

Estudos preliminares sobre a termodinâmica de complexação dessas drogas com ácido Cloranílico revelaram altas e negativas constantes de equilíbrio e valores de mudança de energia livre elevados, o que sugere uma boa estabilidade dos complexos ^[34].

7. Parte Experimental

Amostras

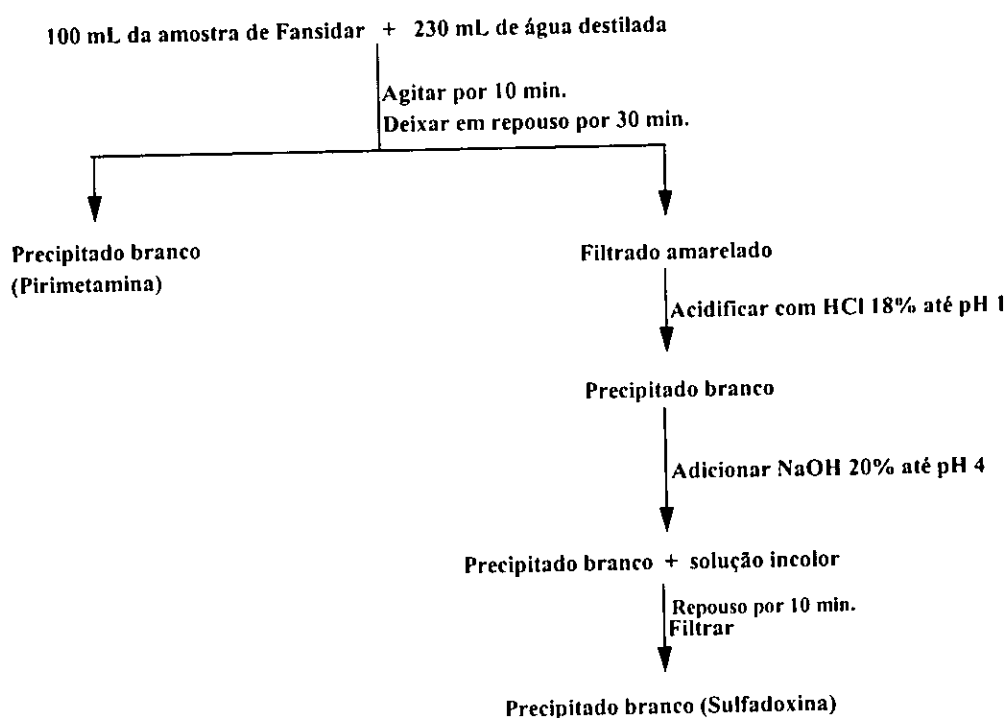
- *Fansidar injectável*- Fornecido pela MEDIMOC e utilizados para o isolamento de Sulfadoxina e Pirimetamina
- *Três amostras de Fansidar em comprimidos de diferentes fabricantes*- Fornecidos pelo Laboratório Nacional de Controle de Qualidade de Medicamentos utilizado para a análise simultânea das drogas.

7.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

7.1.1. Isolamento e purificação de Sulfadoxina e Pirimetamina

7.1.1.1. Isolamento

A Sulfadoxina e Pirimetamina foram isolados a partir de amostras de Fansidar sob a forma injectável usando a seguinte técnica:



O isolamento de cada um dos compostos foi feito em triplicado, tendo-se obtido as seguintes massas:

Resultados Obtidos

para a Sulfadoxina

Tabela 3: Resultados do isolamento da Sulfadoxina

Massa teórica (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
20.0	19.66	98.30
20.0	18.98	94.90
20.0	19.09	95.45
<i>Média:</i> 20.0	<i>Média:</i> 19.2	<i>Média:</i> 96.2

Para a Pirimetamina

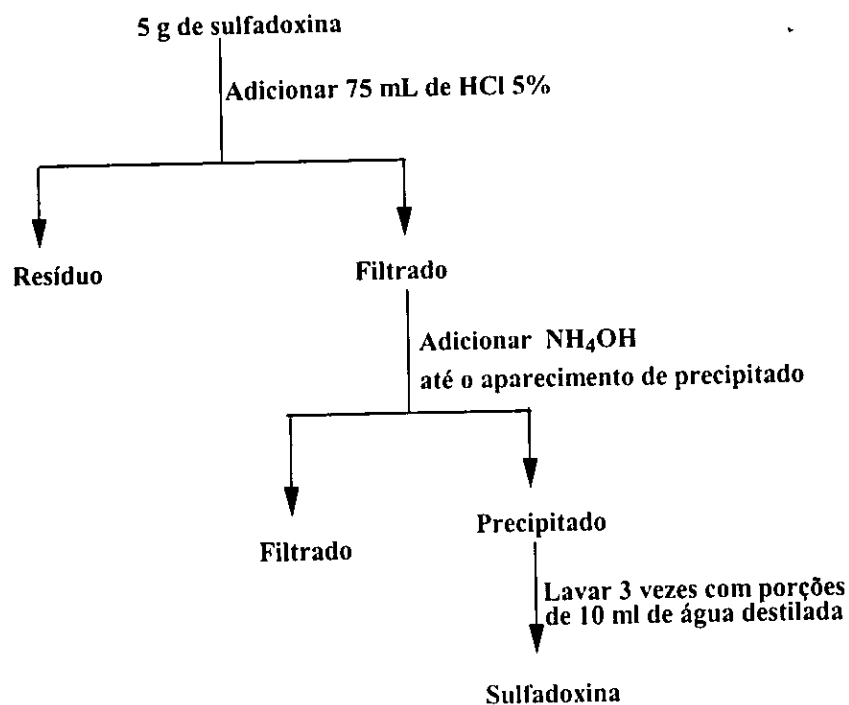
Tabela 4: Resultados do isolamento da Pirimetamina

Massa teórica (g)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
1.0	0.99	99
1.0	0.98	98
1.0	1.00	100
<i>Média:</i> 1.0	<i>Média:</i> 0.99	<i>Média:</i> 99.0

7.1.1.2. Purificação

a) Sulfadoxina

A purificação da Sulfadoxina foi feita por reprecipitação com Ácido clorídrico 5% como vem apresentado a seguir:



Após a reprecipitação da Sulfadoxina foi possível obter um composto mais puro com um rendimento de 92,4%.

b) Pirimetamina

Procedeu-se a recristalização da Pirimetamina com 30 mL de etanol a 96% até a obtenção de composto mais esbranquiçado com um rendimento de 95%.

7.1.1.3. Purificação usando cromatografia de distribuição em coluna

Amostras

- Sulfadoxina e Pirimetamina anteriormente purificadas por reprecipitação e recristalização, respectivamente.

Condições

Fase estacionária: Sílica gel 60 para cromatografia em coluna; 0.063 – 0.200 mm; (70-230 mesh ASTM)

Fase móvel: Acetato de Etilo

Tempo necessário: 1 hora

Procedimentos

Preparou-se uma coluna cromatográfica (de 50 mL de volume) aberta na extremidade superior e com uma camada de vidro porosa na sua extremidade inferior para evitar a passagem da fase estacionária. Preenche-se a coluna até cerca de metade com o Acetato de Etilo (solvente) e com a ajuda de um funil adaptado na parte superior introduz-se, lentamente, 30 g de Sílica gel (fase estacionária) que serão empacotados com o solvente, tendo-se o cuidado de retirar quaisquer bolhas de ar formadas usando uma vareta.

O empacotamento é auxiliado com a introdução e escoamento de novas quantidades de Acetato de Etilo.

NB: A superfície interior da coluna nunca deve ficar livre do solvente.

Depois de ter a coluna preparada deixa-se escoar o Acetato de Etilo até que reste uma pequena quantidade deste por cima da fase estacionária (evitando de todo custo que a coluna seque). Introduz-se na sequência, 0.5 g de Sulfadoxina dissolvida no solvente de

eluição (Acetato de Etilo), com a ajuda de um funil, tomando todo o cuidado para não perturbar a superfície do adsorvente.

Inicialmente deixa-se eluir a Sulfadoxina com um pouco de Acetato de Etilo até quase a secura (evitando que a coluna seque). Introduce-se uma nova quantidade do Acetato de Etilo e a operação continua. A coluna é, então, preenchida com o solvente, e iniciada a eluição propriamente dita. À medida que as fracções vão sendo recolhidas na base da coluna (com o auxílio de vários Erlenmeyers numerados) adiciona-se mais solvente contido num funil de separação colocado na parte superior da coluna.

As fracções são recolhidas de 10 em 10 minutos (100 mL em cada fracção) e vão sendo monitoradas usando TLC (placa: 5 x 5 cm; Sílica gel; volume: 10 µL; tempo: 3 min.), para verificar se todos os componentes da amostra são eluídos e em qual das fracções esses componentes se encontram.

Os mesmos procedimentos são tomados para a purificação da Pirimetamina usando a cromatografia em coluna.

7.1.1.3.1. Resultados Obtidos

Tabela 5: Análise das fracções obtidas durante a CC por TLC

Fracções	TLC para Sulfadoxina	TLC para Pirimetamina	Rf para a Sulfadoxina	Rf para a Pirimetamina
1	Nenhuma mancha	Nenhuma mancha	-	-
2	Uma mancha forte	Nenhuma mancha	0.53	-
3	Uma mancha fraca	Uma mancha forte	0.53	0.36
4	Nenhuma mancha	Uma mancha fraca	-	0.36
5	Nenhuma mancha	Nenhuma mancha	-	-
6	Nenhuma mancha	Nenhuma mancha	-	-

7.1.1.3.2. Análise dos resultados

A Sulfadoxina teve uma eluição mais rápida em relação a Pirimetamina, o que mostra a grande afinidade que ela têm com o solvente. As manchas obtidas para a Sulfadoxina e para a Pirimetamina tinham os mesmos valores de R_fs, o que mostra que os compostos analisados já eram puros e com isso prova-se que foi possível purificar a Sulfadoxina e a Pirimetamina usando as técnicas acima descritas.

7.1.1.4. Confirmação da Pureza usando Cromatografia em Camada fina (TLC)

Na análise da pureza de Sulfadoxina e Pirimetamina foram usadas as seguintes condições:

Placas ou fases estacionárias: de Alumínio: Sílica gel 60 F254

Espessura: 0.2 mm

Dimensões da placa: 10x10 cm

Fases móveis:

1º sistema: *Acetato de etilo – Metanol (9:1) v/v*

2º sistema: *Clorofórmio – Acetona (4:1) v/v*

3º sistema: *Acetato de etilo*

Deteção: Usando revelador de UV/VIS a 360 nm e depois com vapores de iodo.

Preparação das amostras (Antes e depois da purificação por reprecipitação e recristalização):

Sol. 1: 5 mg de Sulfadoxina + 2 mL de Acetato de Etilo

Sol. 2: 5 mg de Pirimetamina + 2 mL de Acetato de Etilo

Sol. 3: 5 µL de Fansidar injectável

NB: As mesmas quantidades das amostras e de solvente foram usadas para a preparação das soluções das amostras com os outros sistemas de solventes.

A análise cromatográfica por TLC foi feita antes e depois da purificação de Sulfadoxina e Pirimetamina.

Procedimentos

Aplica-se em pontos separados da placa cromatográfica, a 1 cm da borda inferior e mantendo cerca de 2 cm de distância entre os pontos de aplicação com o auxílio de tubos capilares, 5 μ L das soluções de Sulfadoxina, Pirimetamina e de Fansidar injectável.

Adiciona-se 5 mL do solvente à cuba de cromatografia e aguarda-se por 15 minutos com a cuba fechada, para que a atmosfera da cuba fique saturada com os vapores do solvente de eluição.

Introduz-se a placa na cuba de modo que o nível do líquido fique abaixo dos pontos de aplicação e depois espera-se pelo desenvolvimento do cromatograma mantendo a cuba fechada.

Quando a fase móvel chegar a 1 cm da borda superior da placa, retira-se e deixa-se secar totalmente no meio ambiente. (10-15 min.)

Antes da revelação da placa com o iodo examina-se sob luz Ultravioleta a 366 nm. Marca-se cuidadosamente o contorno das manchas das substâncias com o auxílio de uma lapiseira.

Para revelação definitiva, as placas são inseridas em um recipiente seco contendo um pouco de cristais de iodo sólido. Fecha-se devidamente a câmara de iodo e aguarda-se o surgimento de manchas na placa.

Por fim, mede-se a partir da margem inferior da placa até ao centro de cada mancha as distâncias percorridas pelos componentes de cada amostra analisada.

Resultados obtidos

Antes da purificação: Obtêm-se duas manchas para cada uma das soluções, uma correspondente a Sulfadoxina, uma correspondente a Pirimetamina e as outras duas manchas têm valores de Rf muito baixos.

Após a purificação: Obtêm-se uma mancha para a solução correspondente a Sulfadoxina, uma mancha para a solução correspondente a Pirimetamina e duas manchas para o Fansidar injectável.

Os valores dos Rfs dos diferentes sistemas usados, que determinam o posicionamento das manchas foram obtidos usando a relação que já foi acima mencionada ($D1 = 8 \text{ cm}$) e para melhor elucidar os dados encontram-se resumidos na tabela seguinte:

Tabela 6: Valores de Rf obtidos na experiência e encontrados na literatura¹¹⁴

Amostra	Sistema de solventes	Rfs experimentais		Rfs da literatura
		Antes da purificação	Após a purificação	
<i>Sulfadoxina</i>	1°	0.025 ; 0.1	0,1	0,08
	2°	0.038 ; 0.39	0,39	0,37
	3°	0.031 ; 0.53	0,53	0,51
<i>Pirimetamina</i>	1°	0.035 ; 0.04	0,04	-
	2°	0.038 ; 0.31	0,31	-
	3°	0.035 ; 0.36	0,36	-
<i>Fansidar injectável</i>	1°	0,09 ; 0.04	0,09 ; 0.04	-
	2°	0,39 ; 0.31	0,39 ; 0.31	-
	3°	0,53 ; 0.35	0,53 ; 0.35	-

Análise dos resultados

A análise cromatográfica por TLC das soluções correspondentes a Sulfadoxina e a Pirimetamina logo após o seu isolamento mostra duas manchas para cada sistema de solvente. Das duas manchas uma é muito pequena e de coloração castanha muito fraca com valores de Rf muito baixos (pode ser causada por impurezas adquiridas durante o seu isolamento), a outra mancha corresponde em posição, tamanho, forma, cor e intensidade com as manchas das mesmas substâncias na amostra do Fansidar injectável e os valores de Rf são muito próximos aos dados da literatura.

Após a purificação da Sulfadoxina e Pirimetamina fez-se também o controlo de pureza por TLC tendo-se constatado que as manchas correspondentes à Sulfadoxina e Pirimetamina isolados correspondem em posição, tamanho, forma e intensidade com as manchas das mesmas substâncias na amostra do Fansidar injectável e com os valores de Rf muito próximos aos da literatura.

7.1.1.5. Confirmação da estrutura usando Espectrofotometria de infravermelho e espectrofotometria de massa

Amostras

- Sulfadoxina e Pirimetamina após a purificação por reprecipitação e recristalização, respectivamente.

7.1.1.5.1. Espectro de infravermelho de Pirimetamina

Os espectros IV da Pirimetamina e Sulfadoxina foram tirados num espectrofotômetro de marca Shimadzu.

A estrutura da Pirimetamina tem correlação com as bandas representadas na seguinte tabela:

Tabela 7: Análise da Pirimetamina por espectrofotometria de IV

Grupo molecular	Características	Frequências tabeladas (cm^{-1}) ^[40, 48]	Frequências obtidas (cm^{-1})
NH ₂ amina	<i>vs, as</i>	3310 - 3440	3377.12 e 3465.84
C-H	<i>v</i>	1089	1089.71
C=N _{aromática}	<i>va</i>	1650	1650.95
C=C _{aromática}	<i>va</i>	1560 - 1630	1591.17
Cl-C _{aromático}		830	839.29
C-H	δ	760 - 810	767.86
CH ₃	δ s, as	1375 e 1450	1375 e 1446.51
CH ₂	<i>vas, s</i>	2926 e 2853	2928.57 e 2839.29
CH ₃ e CH ₂	<i>vas</i>	1410 - 1483	1410.71

Interpretação do espectro

- 1650.95 cm^{-1} provocada pela distensão assimétrica do grupo $\text{C}=\text{N}_{\text{aromática}}$;
- 1591.17 cm^{-1} que é provocada pela distensão do grupo $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático
- 1089.71 cm^{-1} que é provocada pela distensão do grupo $\text{C}-\text{H}$ do anel aromático.
- 839.29 cm^{-1} provocada pela presença do $\text{Cl}-\text{C}_{\text{aromático}}$ na molécula da Pirimetamina
- 767.86 cm^{-1} que mostra a absorção aromática forte provocada pela deformação fora do plano do grupo $\text{C}-\text{H}$;
- 3238.26 e 3421.48 cm^{-1} que são duas bandas provocadas pela vibração assimétrica e simétrica do grupo amino primário NH_2 na molécula da Pirimetamina;
- 1410.75 cm^{-1} que é uma banda sobreposta provocada pela presença dos grupos CH_3 e CH_2 na molécula;
- 1375 e 1446.51 cm^{-1} que são bandas provocadas pela deformação angular simétrica e assimétrica, respectivamente do grupo metila CH_3 ;
- 2928.57 e 2839.29 cm^{-1} que são bandas provocadas pela distensão assimétrica e simétrica do grupo CH_2 .

7.1.1.5.2. Espectro de massa de Pirimetamina

Os iões mais importantes da Pirimetamina e suas abundâncias estão demonstrados na tabela seguinte:

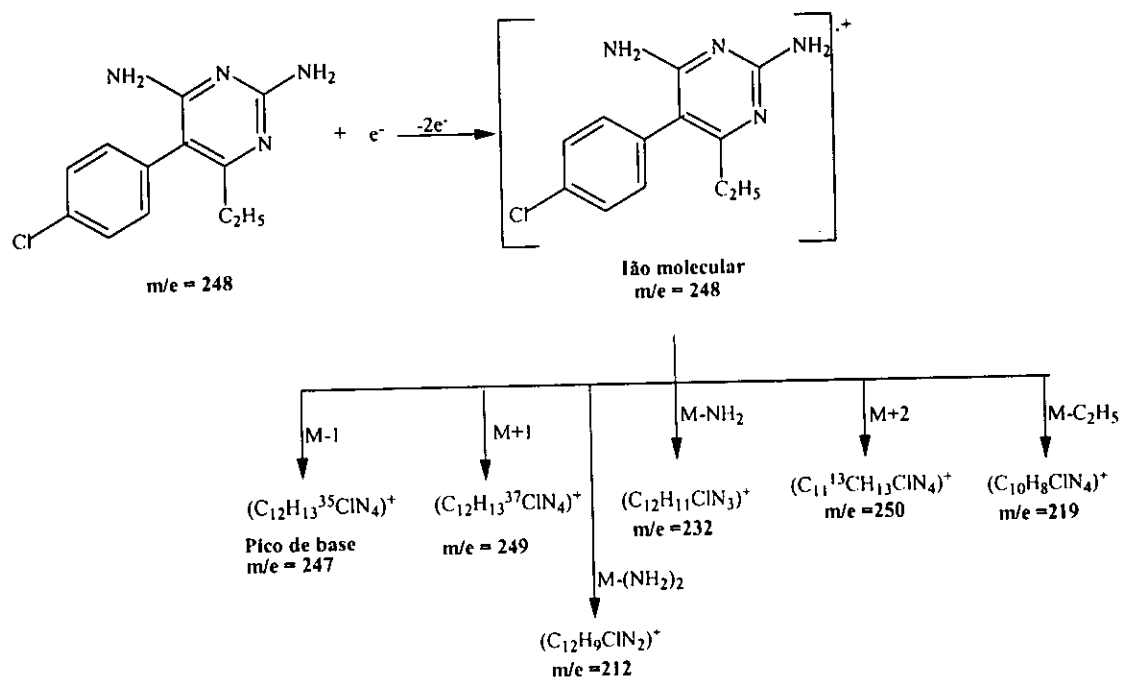
Tabela 8: Análise da Pirimetamina por espectrofotometria de massa

Dados teóricos (m/e) ^[13]	Dados experimentais (m/e)	Fragmentos	Abundância teóricas (%)	Abundância experimentais (%)
247	247	M-1 devido ao isótopo Cl-35	100 (Pico da base)	100 (Pico da base)
248	248	M ⁺ (ião molecular)	50	50
249	249	M ⁺¹ devido ao isótopo Cl-37	36	36
250	250	M+2	15	15
219	219	M-C ₂ H ₅	12	12
212	212	M-Cl	10	10
232	232	M-NH ₂	5	5

Interpretação do espectro

O espectro de massa da Pirimetamina mostra um pico do M⁺, m/e igual a 248, que deve-se apenas ao ião molecular de fórmula (C₁₂H₁₃ClN₄)⁺. Há um pico de m/e igual a 249, o pico M+1, que é devido ao isótopo ³⁷Cl (C₁₂H₁₃³⁷ClN₄)⁺, um pico de M+2 de m/e igual a 250, devido ao isótopo ¹³C (C₁₁¹³CH₁₃ClN₄)⁺ e um pico M-1 de m/e igual a 247, devido ao isótopo ³⁵Cl (C₁₂H₁₃³⁵ClN₄)⁺. Os picos isotópicos são muito menos intensos do que o pico do ião molecular M⁺, em virtude da baixa abundância natural dos isótopos.

Fragmentação possível



7.1.1.5.4. Espectro de infravermelho da Sulfadoxina

O espectro IV da Sulfadoxina foi tirado num espectrofotômetro de marca Shimadzu.

Tabela 9: Análise da Sulfadoxina por espectrofotometria de IV

Grupo molecular	Características	Frequências tabeladas (cm ⁻¹) [40, 48]	Frequências obtidas (cm ⁻¹)
C=C _{aromático}	δ	1500 - 1600	1558.38 e 1575.73
C-SO ₂ -N	ν _s	1150 - 1180	1160.71
C-N	δ	1180 - 1360	1303.57
=C-N-H _{aminas}	ν	1250 - 1360	1285.71
O=S=O	ν _{as}	1000 - 1400	1017.89
C-O-C	δ _{as}	1247	1223.21
NH _{aminas prim.}	δ	3300 - 3500	3296.12 e 3465.84

NH _{aminas sec.}	δ	3300 – 3500	3481.27
N-H	ν	1600-1640	1627.81 e 1647.10
C-H _{aromático}	δ	3000 - 3200	3145.68
C-H _{metila}	δ	2835 – 2950	2964.29
CH ₃	$\delta_{s,as}$	1375, 1450	1401.79, 1438.80

Interpretação do espectro

- 1627.81 e 1647.10 que são provocadas pela distensão do grupo N-H no anel aromático.
- 1567.27 cm⁻¹ que é provocada pela distensão do grupo C=C do anel aromático;
- 1160.71 cm⁻¹ provocada pela banda do grupo C-SO₂-N;
- 1303.57 cm⁻¹ provocada pela deformação da ligação C-N;
- 1285.71 cm⁻¹ provocada pela distensão do grupo = C-N-H devido a presença do grupo amina.
- 1017.89 cm⁻¹ provocada pela distensão do grupo O=S=O;
- 1223.21 cm⁻¹ provocada pela distensão do grupo C-O-C ;
- 3296.12 e 3465.84 cm⁻¹ são bandas de distensão que mostram a presença do grupo amina primário na molécula da Sulfadoxina;
- 3481.27 cm⁻¹ que é provocada pela distensão do grupo N-H das aminas primárias;
- 3145.68 cm⁻¹ que é uma banda de distensão da ligação C-H, também provocada pela presença do anel aromático;
- 2964.29 cm⁻¹ provocada pela distensão do grupo C-H do metila;
- 1401.79 e 1438.80 cm⁻¹ que são bandas provocadas pela deformação simétrica e assimétrica do grupo CH₃.

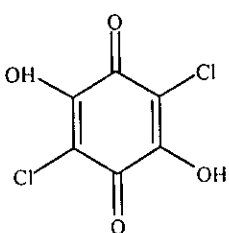
7.1.2. Determinação quantitativa simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina no Fansidar sob a forma de comprimidos

O teste é baseado na reação do Ácido cloranílico, uma molécula típica π - receptora com Sulfadoxina e Pirimetamina, na qual ambos são π - dadores, usando como solvente o 1,4-Dioxano

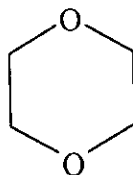
❖ Ácido Cloranílico

O *Ácido cloranílico* é um exemplo dos π - receptores. Este é preparado a partir do Cloranil por hidrólise alcalina ^[28, 49].

Tabela 10: Propriedades do Ácido cloranílico ^[49].

Ácido Cloranílico	
Nomes IUPAC ^[49] .	2,5-dicloro-3,6-dihidroxi-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona; 2,5-dicloro-3,6-dihidroxi-p-benzoquinona
Fórmula estrutural	
Fórmula molecular e massa molar	C ₆ H ₂ Cl ₂ O ₄ ; 208.99 g/mol
Composição elementar	C 34,48%; H 0,96%; O 33,93%; Cl 30,62%
Características	Cristais vermelhos alaranjados
Espectros de UV	Absorção a 290-340 nm e 520-555 nm
Pontos de fusão	282-284 °C
Outros usos	Formação de sais estáveis com cátions metálicos; usado na espectrofotometria; usado na análise de compostos inorgânicos por Cromatografia em papel.

❖ **1,4- Dioxano**



Na sua forma mais pura, o 1,4-Dioxano tem *Pe*: 101°C; *Pf*: 12 °C; *p*: 1,034 g/mL ¹⁶¹.
Este é miscível com água em quaisquer proporções e o seu azeótropo com a água tem ponto de ebulição de 87,8 °C e contém 81,6% de Dioxano ¹⁶¹.

O Dioxano pode conter impurezas de *ácido acético*, *água* e *etilenouacetal do acetaldeído sobre a forma de peróxido* ¹⁶¹.

A escolha do 1,4- Dioxano, um solvente com baixa constante dielétrica diminui severamente a capacidade para a solvatação das moléculas em análise e do complexo, além disso, o tamanho molecular das drogas não favorece as actividades de solvatação.

7.1.2.1. Determinação da absorção máxima para ácido cloranílico e seus complexos com Sulfadoxina e Pirimetamina

Preparar uma solução de ácido cloranílico de $4,5 \times 10^{-3}$ M em 1,4-Dioxano e depois determinar a sua absorção máxima usando a espectrofotometria de UV/VIS.

Preparar as Soluções de Sulfadoxina ($1,613 \times 10^{-2}$ M) e Pirimetamina ($1,004 \times 10^{-2}$ M) em 1,4-Dioxano.

Foram preparadas soluções de 100 mL para cada uma das substâncias e os dados usados estão anexos na seguinte tabela:

Tabela 11: Dados usados na preparação das soluções

	Conc. (M)	Massa molar (g/mol)	V (ml)	n (moles)	m (g)
<i>Ac. Cloranílico</i>	4.500×10^{-3}	208,990	100	4.500×10^{-4}	0.094
<i>Sulfadoxina</i>	1.613×10^{-2}	310,330	100	1.613×10^{-3}	0.501
<i>Pirimetamina</i>	1.004×10^{-2}	248,710	100	1.004×10^{-3}	0.250

Solução	Cor
<i>Ácido Cloranílico</i>	Solução alaranjada

Tabela 12: Leitura das absorvâncias do ácido Cloranílico em triplicado e suas médias

λ nm	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600
A1	0.231	0.242	0.287	0.241	0.241	0.191	0.142	0.073	0.024	0.013	0.06	0.04
A2	0.227	0.240	0.288	0.239	0.240	0.193	0.145	0.072	0.025	0.012	0.07	0.03
A3	0.232	0.238	0.289	0.240	0.239	0.192	0.145	0.071	0.023	0.011	0.05	0.02
Am	0.230	0.240	0.288	0.240	0.240	0.192	0.144	0.072	0.024	0.012	0.06	0.03

Transfere-se 1 mL da solução de Sulfadoxina para um balão volumétrico de 10 mL, adiciona-se 1 mL de ácido Cloranílico e completa-se o volume com 1,4-Dioxano. Os mesmos procedimentos são tomados para a solução da Pirimetamina.

As soluções são bem misturadas e deixadas em repouso por 30 minutos para as cores se desenvolverem intensamente e depois analisadas por espectrofotometria de UV/VIS para a obtenção dos máximos de absorção num intervalo de comprimentos de onda de 380-600 nm.

Tabela 13: Coloração dos complexos

Solução	Cor
<i>Complexo de Sulfadoxina</i>	Solução amarelada
<i>Complexo de Pirimetamina</i>	Solução violeta

Depois de preparados os complexos foi feita a respectiva análise dos máximos de absorção, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Tabela 14: Leitura das absorvâncias do complexo de Sulfadoxina em triplicado

λ nm	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600
A1	0.250	0.3526	0.383	0.576	0.791	0.959	1.129	1.007	0.910	0.841	0.671	0.624
A2	0.248	0.3529	0.385	0.577	0.793	0.961	1.128	1.009	0.913	0.841	0.673	0.623
A3	0.252	0.3529	0.384	0.575	0.792	0.960	1.127	1.008	0.913	0.838	0.672	0.625
Am	0.250	0.3528	0.384	0.576	0.792	0.960	1.128	1.008	0.912	0.840	0.672	0.624

Tabela 15: Leitura das absorvâncias do complexo de Pirimetamina em triplicado

λ nm	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600
A1	0.241	0.288	0.311	0.337	0.354	0.407	0.743	1.080	1.033	0.384	0.289	0.216
A2	0.238	0.287	0.312	0.336	0.353	0.409	0.744	1.079	1.032	0.385	0.288	0.215
A3	0.241	0.289	0.313	0.335	0.352	0.408	0.745	1.081	1.031	0.383	0.287	0.217
Am	0.240	0.288	0.312	0.336	0.353	0.408	0.744	1.080	1.032	0.384	0.288	0.216

Usando as médias das absorvância nas ordenadas e os comprimentos de onda nas abscissas foi obtido o seguinte gráfico:

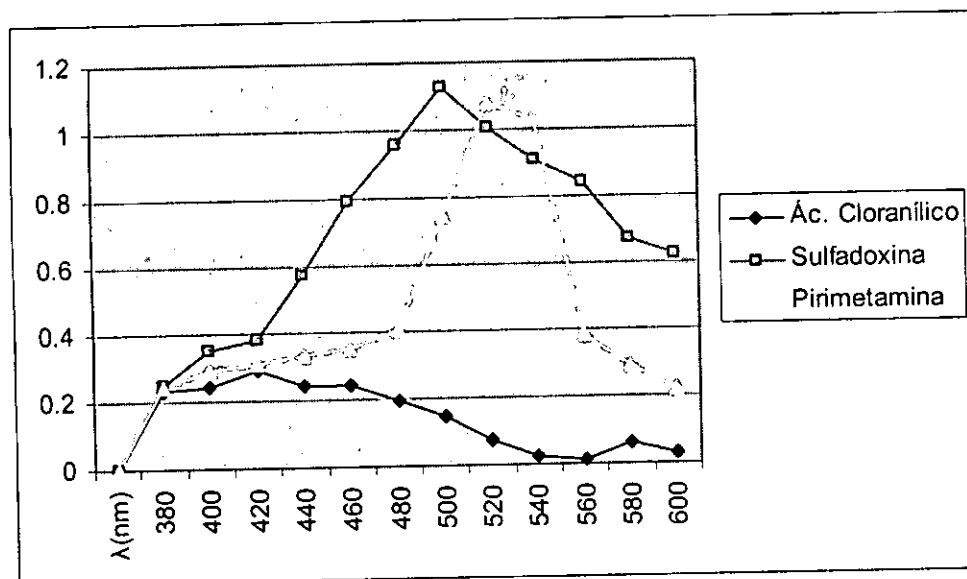


Figura 2: Absorção máxima para ácido Cloranílico (1), Sulfadoxina (2) e Pirimetamina (3)

Análise dos resultados

De acordo com os dados obtidos, o ácido Cloranílico apresenta comprimento de onda máximo a 420 nm e a sua absorvância máxima é de 0.2880. O Complexo de Sulfadoxina apresenta um comprimento de onda máximo de 500 nm e Absorvância máxima de 1.1280 e o complexo de Pirimetamina apresenta um comprimento de onda máximo de 520 nm com uma absorvância máxima de 1.0800.

7.1.2.4. Construção da curva de calibração

Usando padrões de Sulfadoxina e Pirimetamina preparam-se soluções stock com 1,4-Dioxano como solvente contendo $1,613 \times 10^{-2}$ M de Sulfadoxina e $1,004 \times 10^{-2}$ M Pirimetamina em 2 balões de 10 mL (Solução de Sulfadoxina num balão e Pirimetamina noutro).

Em 3 balões de 10 mL transfere-se com exactidão 1,0; 2,0 e 5,0 mL (1.613×10^{-3} , 3.226×10^{-3} e 8.065×10^{-3} M) de Sulfadoxina e adiciona-se em cada balão 1 mL de ácido Clorânico ($4,5 \times 10^{-3}$ M) completando-se depois o volume usando 1,4-Dioxano e por fim agita-se muito bem até a completa homogeneização da solução.

Os mesmos procedimentos são tomados para a Pirimetamina.

Tabela 16: Dados necessários para a preparação das soluções

Sulfadoxina				Pirimetamina			
V ₁ (mL)	C ₁ (M)	V ₂ (mL)	C ₂ (M)	V ₁ (mL)	C ₁ (M)	V ₂ (mL)	C ₂ (M)
1	1.613×10^{-2}	10	1.613×10^{-3}	1	1.004×10^{-2}	10	1.004×10^{-3}
2	1.613×10^{-2}	10	3.226×10^{-3}	2	1.004×10^{-2}	10	2.008×10^{-3}
5	1.613×10^{-2}	10	8.065×10^{-3}	5	1.004×10^{-2}	10	3.012×10^{-3}

Essas soluções são deixadas em repouso por 30 minutos e as suas absorvâncias são monitoradas de 24 em 24 horas por 96 horas.

Depois faz-se a leitura das absorvâncias e os valores obtidos são mostrados na tabela seguinte:

Tabela 17: Absorvâncias de complexos Sulfadoxina e Pirimetamina e suas médias

Solução	Conc. (M)	Absorvâncias					
		30 min.	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Média
<i>Sulfadoxina</i>	1.613×10^{-3}	0.0099	0.0099	0.0098	0.0098	0.0098	0.00984
	3.226×10^{-3}	0.0102	0.0102	0.0101	0.0101	0.0101	0.01014
	8.065×10^{-3}	0.0111	0.0111	0.0112	0.0111	0.0110	0.01110
<i>Pirimetamina</i>	1.004×10^{-3}	0.0065	0.0065	0.0064	0.0064	0.0064	0.00644
	2.008×10^{-3}	0.0067	0.0067	0.0067	0.0067	0.0066	0.00668
	5.012×10^{-3}	0.0075	0.0075	0.0075	0.0074	0.0074	0.00746

Por fim faz-se a curva de calibração usando as médias das absorvâncias e as suas concentrações.

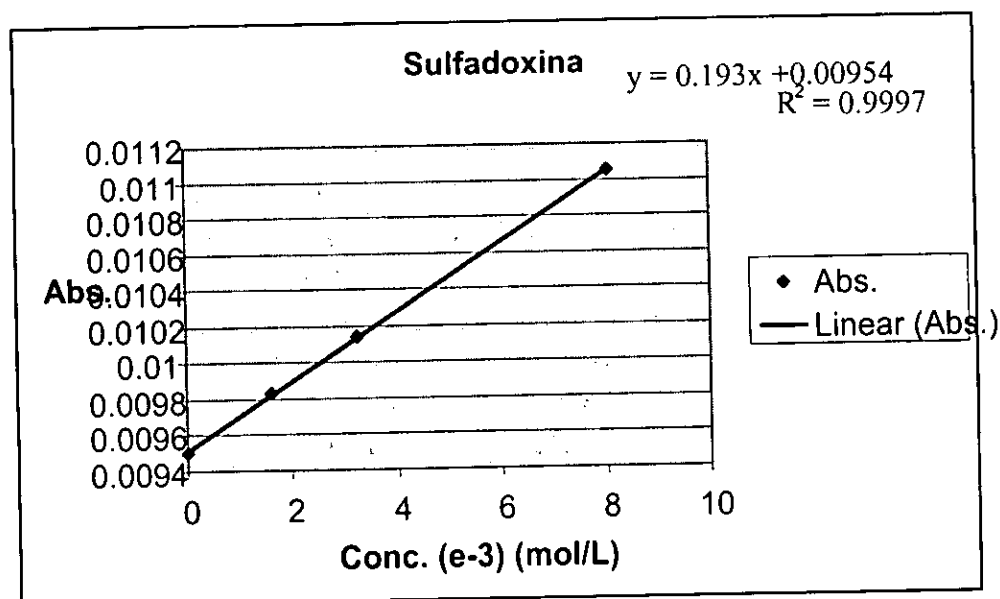


Figura 3: Curva de calibração para o complexo de Sulfadoxina

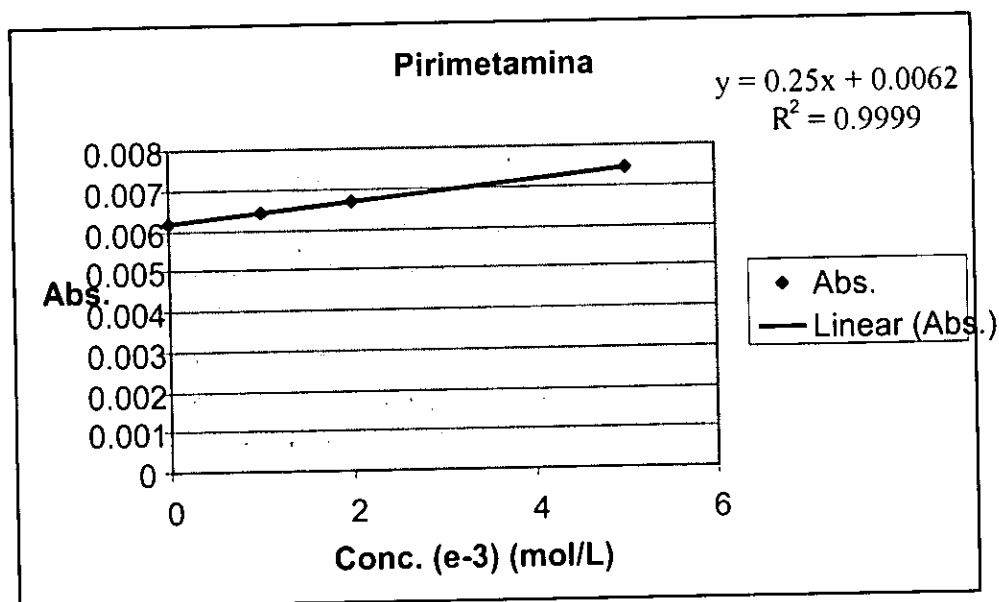


Figura 4: Curva de calibração para o complexo de Pirimetamina

7.1.2.5. *Determinação simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina*

O Fansidar (0,5 g de Sulfadoxina e 0,025 g de Pirimetamina) previamente triturado é colocado num balão volumétrico de 100 mL e adiciona-se 1,4-Dioxano para dissolver e depois aumenta-se até completar o volume.

Pega-se um balão de 10 mL e coloca-se 1,0 mL da solução preparada (1.6112×10^{-2} M de Sulfadoxina e 1.0052×10^{-3} M de Pirimetamina), depois adiciona-se 1,0 mL de ácido Cloranílico ($4,5 \times 10^{-3}$ M) e 1,4-Dioxano até completar o volume. Essa solução fica em repouso por 30 minutos.

Depois procede-se a leitura das absorvâncias em simultâneo usando as absorções máximas de Sulfadoxina e Pirimetamina, isto é, 500 e 520 nm, respectivamente e com a ajuda das curvas padrão calcula-se a quantidade em percentagem de Sulfadoxina e Pirimetamina recuperados individualmente.

Nesta análise foram usadas três marcas de Fansidar de diferentes fabricantes (A, B e C), tendo-se tomado os mesmos procedimentos acima descritos para cada marca.

Tabela 18: Dados necessários para a preparação das soluções

Composto	C_1 (M)	V_1 (mL)	C_2 (M)	V_2 (mL)
<i>Ác. Cloranil.</i>	4.5×10^{-3}	1	4.5×10^{-4}	10
<i>Sulfadoxina</i>	1.6112×10^{-2}	1	1.6112×10^{-3}	10
<i>Pirimetamina</i>	1.0052×10^{-3}	1	1.0052×10^{-4}	10

Depois de preparadas todas soluções, com um repouso de 30 minutos, foram analisadas as absorvâncias de cada solução, tendo-se obtido os seguintes dados:

Tabela 19: Absorvâncias do complexo A para a determinação simultânea

Amostra	Complexo/(λ)	Absorvâncias					
		1	2	3	4	5	M
A	<i>Sulf/ (500nm)</i>	0.0098	0.0099	0.0098	0.0098	0.098	0.00982
	<i>Pir/ (520 nm)</i>	0.0063	0.0064	0.0064	0.0065	0.0064	0.0064

Tabela 20: Absorvâncias do complexo B para a determinação simultânea

Amostra	Complexo/(λ)	Absorvâncias					
		1	2	3	4	5	M
B	<i>Sulf/(500nm)</i>	0.0098	0.0099	0.0099	0.0098	0.099	0.00986
	<i>Pir/ (520 nm)</i>	0.00643	0.00645	0.00643	0.00643	0.00641	0.00643

Tabela 21: Absorvâncias do complexo C para a determinação simultânea

Amostra	Complexo/(λ)	Absorvâncias					
		1	2	3	4	5	M
C	<i>Sulf/(500nm)</i>	0.0101	0.0100	0.0099	0.0098	0.0097	0.0099
	<i>Pir/(520 nm)</i>	0.0067	0.0065	0.0067	0.0066	0.0065	0.0066

7.1.2.5.1 Determinação das concentrações de Sulfadoxina e Pirimetamina nas amostras

A determinação das concentrações de Sulfadoxina e Pirimetamina é feita por interpolação usando as curvas de calibração.

Sulfadoxina : $A = 0.193X_1 + 0.00954$

Pirimetamina : $A = 0.25 X_2 + 0.0062$

Tabela 22: Cálculos das concentrações de Sulfadoxina e Pirimetamina em cada marca

Amostra	A		B		C	
	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>
Complexo						
Abs. média	0.00985	0.00623	0.00986	0.00623	0.00985	0.00624
Conc. (M)	1.58×10^{-3}	1.0×10^{-4}	1.66×10^{-3}	0.96×10^{-4}	1.61×10^{-3}	0.997×10^{-4}
Volume(mL)	10	10	10	10	10	10
n (Moles)	1.58×10^{-5}	1.0×10^{-6}	1.66×10^{-5}	0.96×10^{-6}	1.61×10^{-5}	0.997×10^{-6}

As amostras de Fansidar usadas têm as seguintes quantidades de Sulfadoxina e Pirimetamina:

Tabela 23: Cálculo das quantidades em massa de 1 mL das soluções preparadas

Amostra	A		B		C	
	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>
Composto						
n (Moles)	1.58×10^{-5}	1.0×10^{-6}	1.66×10^{-5}	0.96×10^{-6}	1.61×10^{-5}	0.997×10^{-6}
Massa molar (g/mol)	310.33	248.71	310.33	248.71	310.33	248.71
m (g)	0.0049032	0.00024897	0.0051515	0.00023833	0.0050032	0.00024794

As quantidades da Sulfadoxina e Pirimetamina acima calculadas correspondem a 1 mL da solução mãe para a determinação simultânea, então, como um comprimido foi diluído até o volume de 100 mL, temos a massa obtida multiplicada por 100. Essa massa final é a

massa original da Sulfadoxina e Pirimetamina em cada uma das amostras de Fansidar analisadas.

Tabela 24: Massa total da Sulfadoxina e Pirimetamina em cada comprimido e seus rendimentos

Amostra	A		B		C	
	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>	<i>Sulf.</i>	<i>Pir.</i>
m (g)	0.49022	0.024897	0.51515	0.023833	0.50032	0.024794
$m_{teórica}$ (g)	0.5	0.025	0.5	0.025	0.5	0.025
Rend. %	98.04	99.5	103.03	95.33	100.06	99.18

7.2. Análise das curvas de calibração

Desvio padrão (RSD) da precisão da técnica analítica foi de 1.04%.

Tabela 25: Análise das curvas de calibração

Dados estatísticos	Sulfadoxina	Pirimetamina
<i>Limite de detecção (mol/L)</i>	$1.61 \times 10^{-5} - 3.22 \times 10^{-5}$	$2.01 \times 10^{-5} - 4.02 \times 10^{-5}$
<i>Limite de quantificação (mol/L)</i>	$4.83 \times 10^{-5} - 6.44 \times 10^{-5}$	$6.03 \times 10^{-5} - 8.04 \times 10^{-5}$
<i>Coefficiente de regressão</i>	0.9997	0.9999
<i>Desvio padrão da intercepção (%)</i>	0.55	0.35
<i>Desvio padrão da inclinação (%)</i>	1.03	1.60
<i>Equação da recta</i>	$A = 0.193X_1 + 0.00954$	$A = 0.25X_2 + 0.0062$

7.3. Análise dos resultados

- A partir do Fansidar injectável obteve-se a Sulfadoxina e a Pirimetamina com rendimentos de 92.4 e 95%, respectivamente.
- O teste de pureza desses compostos foi feito usando a Cromatografia em Camada Fina com diferentes solventes. Usando o Acetato de etilo-Metanol (9:1) obteve-se um $R_f = 0.1$, com o Clorofórmio - Metanol (4:1) $R_f = 0.39$ e usando o Acetato de etilo obteve-se um $R_f = 0.53$ para a Sulfadoxina (que conferem com os valores de R_f s tabelados) e para a Pirimetamina foram obtidos R_f s iguais a 0.04, 0.31 e 0.36, respectivamente.
- A análise TLC usando como fase móvel o Acetato de Etilo mostrou bons resultados no que diz respeito a separação das manchas e os valores de R_f da Sulfadoxina e Pirimetamina aparecem muito diferentes, o que fez com que se escolhesse esse solvente para a cromatografia em coluna.
- Os complexos formados entre o ácido Cloranílico com a Sulfadoxina (amarelado) e Pirimetamina (violeta), têm absorções máximas à 500 e 520 nm, respectivamente. A solução ligeiramente alaranjada do ácido Cloranílico em 1,4-Dioxano tem uma absorção máxima de 420 nm (fig. 1).
- A mudança da cor observada mostra que nos complexos formados ocorrem interações de transferência de carga onde o ácido Cloranílico é o π -receptor e as drogas são os π -doadores.
- As cores dos complexos são estável por um período de 24 horas e a solução dessas drogas num solvente inerte não mostra nenhuma evidência de decomposição em um período de 96 horas, o que mostra a sua estabilidade em solução.

- A precisão da técnica analítica dá-nos um desvio padrão RSD de 1.04%, o qual sugere um elevado grau de reprodutibilidade e a exactidão foi de 95 - 99%.
- O limite de detecção foi de cerca de 1.61×10^{-5} - 3.22×10^{-5} mol/L para a Sulfadoxina e 2.01×10^{-5} - 4.02×10^{-5} mol/L para a Pirimetamina e o limite de quantificação foi de cerca de 4.83×10^{-5} - 6.44×10^{-5} mol/L para a Sulfadoxina e 6.03×10^{-5} - 8.04×10^{-5} mol/L para a Pirimetamina.
- As equações das curvas obtidas são:

Para o complexo de Sulfadoxina: $A_1 = 0.193x_1 + 0.00954$

Para o complexo de Pirimetamina: $A_2 = 0.25x_2 + 0.0062$

Onde:

A = Absorvâncias

x_1 e x_2 = Concentração das drogas na mistura final da análise em mol/L.

- Os coeficientes de regressão são de 0.9997 para Sulfadoxina e 0.9999 para Pirimetamina.
- Os desvios padrão relativos RSD para a inclinação e para a intercepção da Sulfadoxina são 1.03 e 0.555, respectivamente, enquanto para a Pirimetamina são 1.6 e 0.35%, respectivamente.
- Os valores dos coeficientes de regressão linear confirmam a ausência dos compostos isométricos no decurso desse estudo analítico.
- Foi feita uma experiência de recuperação quantitativa de Sulfadoxina e Pirimetamina em três marcas de Fansidar fabricadas em Países diferentes, os resultados encontram-se na seguinte tabela:

Marcas	Sulfadoxina		Pirimetamina	
	% recuperação (n = 5)	% RSD	% recuperação (n = 5)	% RSD
Método de transferência de cargas				
<i>A</i>	98.04	2.00	99.5	2.5
<i>B</i>	103.03	2.94	95.33	4.90
<i>C</i>	100.06	0.064	99.18	2.2

No Fansidar a Sulfadoxina e a Pirimetamina têm como limites aceites de 95-105%¹⁴⁷.

Os baixos valores dos RSDs são uma indicação da precisão do método. Com isso, é nossa sugestão que pode-se usar a técnica dador-receptor depois de validada na garantia de qualidade e para uma possível análise que indique a estabilidade dessas drogas.

8. Conclusões e recomendações

8.1. Conclusões

- ✓ A Sulfadoxina e Pirimetamina isolados a partir do Fansidar eram puros, visto que os pontos de fusão para Sulfadoxina foram de 198-201 °C e 240-243 °C para Pirimetamina, os quais são muito próximos aos dados da literatura que são 197-200 °C para Sulfadoxina e 239-242 °C para a Pirimetamina.
- ✓ Soluções de Sulfadoxina e Pirimetamina na presença do ácido Cloranílico formam espontaneamente complexos de coloração violeta com absorção máxima de 500 e 520 nm, respectivamente, tendo o ácido Cloranílico uma absorção máxima a 420 nm.
- ✓ A espontânea formação da coloração violeta e amarelada a partir da solução alaranjada do ácido Cloranílico por reação com as drogas é uma grande evidência da formação de complexo com transferência de carga, visto que a Sulfadoxina e a Pirimetamina usadas estavam no seu estado mais puro.
- ✓ Devido a sua sensibilidade, simplicidade, exactidão e baixos valores de RSDs a técnica dador-receptor pode ser utilizada em condições laboratoriais para uma rápida separação de Sulfadoxina e Pirimetamina, no controlo da qualidade e para uma possível análise de estabilidade dessas drogas.
- ✓ Os resultados deste trabalho demonstram que os complexos de transferência de carga entre o ácido Cloranílico com a Sulfadoxina e Pirimetamina são suficientemente estáveis e podem ser usadas como base para a análise quantitativa dessas drogas.

8.2. Recomendações

- ✓ Recomenda-se que se continue com esse estudo para a análise das constantes de equilíbrio, entropia e entalpias dos complexos de Sulfadoxina e Pirimetamina, com isso se saberá se a formação dos complexos é espontânea ou não e qual é o grau de estabilidade dos mesmos.

- ✓ A determinação simultânea de Sulfadoxina e Pirimetamina pelo método de complexação é uma técnica rápida, precisa e de baixo custo. Uma vez validado o método poderá ser recomendado para a determinação quantitativa simultânea de medicamentos que incorporem estes dois constituintes.

Referências bibliográficas

1. Adikwa, M. U.; Echegi, E. U.; **Detection of diethylcarbamazine on thin-layer plates using π -acceptors in 1,4-Dioxan**; *Acta Pharm.* 47 (1997)143-145.
2. Agostinho, A. Bela; Vlyalko, Ariadna; (2007) ; **Manual para a investigação na avaliação da eficácia da Artemisia Annu Híbrida no tratamento da malária**; editado pelo Instituto Nacional da Saúde; Maputo - Moçambique
3. **A malária-Aula 24**; (2005); págs. 1-6; Baixado do web site <http://dgo.iqm.unicamp.br/disciplinas/pos-graduado/qpu23/aula24.pdf> em 15/07/07
4. Ayed, M. M., S. Belay, M. S. El Adl, A. A. Al Kheir; **Spectrophotometric determination of some corticosteroid drugs through charge-transfer complexes**, *Analyst* 109 (1984) 1417-1422.
5. Azevedo, Joana do P. C.: **Estudo da síntese de fármacos antimaláricos derivados de salicilaldeídos - Seminário em síntese orgânica**; (2004); págs. 2-4; Baixado do web site: <http://www.fc.up.pt/gisocb/pdfs/seminJoana2004.pdf> em 27/07/07
6. Becker, Heinz G. O.; **Organikum – Química Orgânica experimental**; 2ª edição; editora fundação Calouste Gulbenkian; pág. 82, Lisboa –Portugal.
7. Belal, S.; A. A. Al Kheir; AYad M. M.; M. S. El Adl; **Spectrophotometric determination of some pharmaceutical carbonyl compounds through oximation and subsequent complexation reactions**; *Analyst* 111 (1986) 1039-1043.
8. Cravo, Pedro; **Boletim de biotecnologia – Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos**; (2007); Baixado do web site: http://www.WHO.int/emc/amrpdfs/Drugs_resistence_in_malaria.pdf. http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/73/pdf/artigo_malaria.pdf em 27/07/07
9. Estein, M. D., I. D. Lika, T. Chongauphajaisiddhi, A. Sabchareon, H. K. Webster; **Quantitation of fansimef components (mefloquine, sulfadoxine and pyrimethamine) in human plasma by two high-performance liquid chromatographic methods**, *Ther. Drug Monit.* 13 (2) 146-151; (1991).
10. **Farmacopeia Portuguesa**; 6ª edição; gráfica Maradouro – Maia editora; págs. 26-27, 1525-1526; (1997); Lisboa - Portugal.
11. Ferraroni, J. J.; **Malária falciparum resistente à cloroquina e ao Fansidar tratada com minociclina**. *Revista de Saúde pública*, S. Paulo 17 (1983) 328-31., Baixado do web site <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v17n4/07.pdf> em 23/07/07

12. Ferreira, Guilherme N.; **Fansidar (Sulfadoxina + Pirimetamina)**; (2007); Baixado do web site: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlzres/AFAC856B89E1-48CB-A1C7-9518EDE9E7B/535/Fansidar.pdf> em 23/07/07.
13. Florey, Klaus; **Analytical profiles of drug substances Vol. 12**; Academic press editora; págs. 464-482; (1983); USA.
14. Florey, Klaus; **Analytical profiles of drug substances Vol. 17**; Academic press editora; págs. 573-605; (1988); USA.
15. Foster, R.; **Organic Charge-transfer Complexes**, Academic Press. London; págs. 8-31; (1969).
16. Goldsmith, R. S.; **Fármacos antiprotozoários – Farmacologia básica e clínica**; 6ª edição; págs. 596-613; (1998); Rio de Janeiro.
17. Green, M. D., D. L. Mount, G. D. Todd; **Determination of sulfadoxine concentrations in whole blood using C-19 solid-phase extraction, sodium dodecylsulphate and dimethylaminocinnamaldehyde**, *Analyst journal* 120 (10) (1995) 2623-2626
18. Green, M. D., D. L. Mount, R. A. Wirtz, N. J. White; **A colorimetric field method to assess the authenticity of drugs sold as antimalarial artesunate**, *J. pharm. Biomed. Anal.* 24 (1) (2000) 65-70.
19. Green, Michael D.; Nettey, Henry; Rojas, Ofelia Villalva; Pamanivong Chansapha; **Use of refractometry and colorimetry as field methods to rapidly assess antimalarial drug quality**; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 105-110; United States.
20. Hoffmann, F.; **Fansidar (Sulfadoxina-Pirimetamina)**; (2004); La Roche ltd. ; Switzerland; Págs. 2-9; Baixado do web site: <http://www.Rocheusa.com/products/Fansidar/Pi.pdf> em 23/07/07
21. Ibrahim, F. A., M. S. Rizk, S. Belal; **Teteracyanoethylene in pharmaceutical analysis part 1: a spectrophotometric method for the determination of some pharmaceutically important hydrazines and pyralozone derivative**, *Analyst* 111; págs. 1285-1287; (1986).
22. Johannessen, Jane Krogh; Christianen, Ida; Schmidt, Dorte, R.; **Simultaneous determination of Pyrimethamine, Sulfadiazine and N-acetil-Sulfadiazine in plasma for monitoring infants in treatment of congenital toxoplasmosis**; *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2005) 1093-1098; Denmark.
23. Kasture, A. V.; S. G. Wadodkar; K. M. Gokhale; **Pharmaceutical chemistry parte II**; Nirali prakasha editora; págs. 287,292-301; (1993).

24. Khalil, Shaban M.; Mohamed, G. G.; Zayed, M. A.; Elqudaby, H. M.; **Spectrophotometric determination of Chloroquina and Pyrimethamine through ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate**; *Microchemical Journal* **64** (2000) 181-186; Egypt.
25. Kumar, A., P. Pandey, N. Mishra, S. Narad, **influence of electrochemical conditions on palladium (II)-4-amino-N-(5,6-dimethoxy-4-pyrimidinyl)-benzenesulfonamide (sulfadoxine) wave at dropping-mercury electrode**, *Chem. Anal. (Warsaw)* **41** (1) (1996) 121-124.
26. Marg, K. S., Krishnan; **Indian pharmacopoeia – Government of India; Ministry of health and family welfare; Vol. II (P-Z)**; Editado por Controller of publications; págs. 646-647, 728-729 ; (1996); Delhi-India.
27. Mariano, Alda; **Boletim de informação terapêutica Vol. 1; 1ª edição; editado pela CIMed/Faculdade de medicina- Universidade Eduardo Mondlane**; págs. 1-4; (2000); Maputo-Moçambique
28. Mofft, A. C.; **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals; body fluids and post-mortem material**; 2ª edição; The pharmaceutical press editora; págs. 160-165; (1986); Grã-Bretanha.
29. Morrison, R.; Boyd, R.; **Química Orgânica**; 13ª edição; Fundações Calouste Gulbenkian editora; págs. 674-676; (1996); Coimbra – Portugal.
30. Mulliken, R. S.; **Molecular complexes**, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 811-813.
31. Muralikrishna, U., M. Krishnamurthy, N.S. Rao; **Analytical uses of charge-transfer complexes: determination of pure and dosage forms of piperazine**, *Analyst* **109** (1984) 1277-1279.
32. Oliaro, P.; **Mode of action and mechanism of resistance for antimalarial drug – Pharmacological therapia Vol. 89**; págs. 207-219; (2001); Amsterdam.
33. Onunkwo, G. C., M. U. Adikwu; **Quantitative reactions of two ampicillins with some π -receptores**, *J. West Afri. Pharm.* (1995) 40-43.
34. Onah, J. O.; **Thin layer chromatographic detection of some common drugs by π -acceptors complexation**; *Acta pharm.* **49** (1999) 217-220.
35. Parimo, P.; **Determination of pyrimethamine in drug preparation by fluorimetry**, *Indian J. Pharm. Sci.* **50** (2) (1988) 114-117.
36. Rao, G. R., S. S. N. Murthy, I. R. K Raju; **Spectrophotometric determination of sulfadoxine and sulfalene (sulfametopyrazine) in combined dosage forms using o-Chloranil**, *Indian Drugs* **26** (5) (1989c) 237-240.

37. Rizk, M.S.; M.I. Watash, F.A. Ibrahim; **Spectrophotometric determination of piperazine by charge-transfer complexation**, *Analyst* 106; págs. 1163-1167; (1981).
38. Sastry, B. S., V. Balakrishna, T. Rama Rao, K. Rama Rao, C. S. P. Sastry; **New methods for the determination of sulphidole and sulfadoxine**, *Indian Drugs* 31 (7) (1994) 307-310.
39. Silva, Hélio S. R. C.; **Antimaláricos potenciais: pró-fármacos poliméricos e formas de liberação controlada de Artemisinina**; (2007); págs. 10-19; Baixado do web site: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/919138/tde-26032007-142010/pdf> em 23/07/07
40. Silversteir, Robert M.; Webster, Francis; **Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos**; 6ª edição; LTC editora; págs. 6-37, 67-103; (2000); Rio de Janeiro – Brasil.
41. Sinnaeve, Bart A.; Decaestecker. Tineke, N.; Risha, Peter G.; Remon, Jean-Paul; **Liquid chromatographic-mass spectrometric assay for simultaneous Pyrimethamine and Sulfadoxine determination in human plasma samples**; *Journal of chromatography A*, 1076 (2005) 97-102; Belgium.
42. Storme, Michael L.; Jansen, F. Herwing; Goeteyn, Win; Bocxlaer, Jan F. V.; **Simultaneous quantitative analysis of the antimalarials Pyrimethamine and Sulfamethoxypyrazine in plasma samples using liquid chromatography/ tandem mass spectrometry**; *Rapid commun. Mass Spectrom* 20 (2006) 2947-2953; Belgium.
43. **The comprehensive resource for phzicians, drug and illness information; Fansidar; antimalarial**; Baixado do web site: [http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20F\)/FANSIDAR.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20F)/FANSIDAR.html) em 23/07/07
44. **The pharmaceutical Codex**; 11ª edição; The pharmaceutical press; pág. 767; (1979); London.
45. **The United States Pharmacopoeia Vol. XIX**; Mack publishing Co.; pág. 430 ; (1965); Easton Pa.
46. Tiscali, Lifestyle; **Fansidar – How does it work**; (2007); Baixado do web site: <http://www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health> em 23/07/07.
47. Towers, Market; **British pharmacopoeia Vol. II**; 1ª edição; London: the stationery office editora; págs. 1554-1555 e págs. 1405-1406; (2001); Grã-Bretanha.
48. Williams, Dudley H.; Fleming, Ian M. A.; **Spectroscopic methods in Organic chemistry**; Raw – Hill publishing; págs. 40-74; (1966); London.
49. Windholz, M.; **The Merck index**; 11ª edição; Merck & Co. Inc.; Rahway, N. J.; pág. 1036; (1976); USA.

50. World Health Organization; **Expert Committee on Malaria**, *Report; 12 nd.* ; págs. 39-42. (Techn. Rep. Ser., 324); (1956); Geneva.
51. World Health Organization; **Scientific Group on Resistance of Malaria Parasites to Drugs**; *Report.* ; pág. 15-28. (Techn. Rep. Ser., 296); (1965); Geneva.

-Anexos-

ANEXO 1

1. Tabelas de tratamento estatístico dos dados

1.1. Para os dados das curvas de calibração

1.1.1. Sulfadoxina

Conc. $1.613 \times 10^{-3} M$

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.00988	0.000054	2×10^{-9}
0.00985	0.000024	5.76×10^{-10}
0.00983	0.000004	1.6×10^{-11}
0.00980	-0.000026	6.76×10^{-10}
0.00977	-0.000056	3×10^{-9}
y _{médio} = 0.009826	Σ = 0.0	Σ = 6×10^{-9}
Desvio padrão (RSD) = 0.0039		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.009826 ± 0.0039		

Conc. 3.226×10^{-3}

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.01019	0.0000484	2×10^{-9}
0.01016	0.0000184	3.3856×10^{-10}
0.01014	-0.0000016	2.56×10^{-12}
0.01011	-0.0000316	9.9856×10^{-10}
0.010108	-0.0000336	1×10^{-9}
y _{médio} = 0.0101416	Σ = 0.0	Σ = 4×10^{-9}
Desvio padrão (RSD) = 0.0033		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.0101416 ± 0.0033		

Conc. 8.065×10^{-3}

Absorvâncias (y)	$y - y_{\text{médio}}$	$(y - y_{\text{médio}})^2$
0.01113	0.000054	2×10^{-9}
0.01110	0.000024	5.76×10^{-10}
0.01108	0.000004	1.6×10^{-11}
0.01105	-0.000026	6.76×10^{-10}
0.01102	-0.000056	3×10^{-9}
$y_{\text{médio}} = 0.011076$	$\Sigma = 0.0$	$\Sigma = 6 \times 10^{-9}$
Desvio padrão (RSD) = 0.004		
Limite de confiança ($y_{\text{médio}} \pm \text{RSD}$) : 0.011076 ± 0.004		

1.1.2. Pirimetamina

Conc. 1.004×10^{-3}

Absorvâncias (y)	$y - y_{\text{médio}}$	$(y - y_{\text{médio}})^2$
0.00649	0.000054	2×10^{-9}
0.00646	0.000024	5.76×10^{-10}
0.00644	0.000004	1.6×10^{-11}
0.00641	-0.000026	6.76×10^{-10}
0.00638	-0.000056	3×10^{-9}
$y_{\text{médio}} = 0.006436$	$\Sigma = 0.0$	$\Sigma = 6 \times 10^{-9}$
Desvio padrão (RSD) = 0.0039		
Limite de confiança ($y_{\text{médio}} \pm \text{RSD}$) : 0.006436 ± 0.0039		

Conc. 2.008x10³

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.00674	0.000054	2 x 10 ⁻⁹
0.00671	0.000024	5.76 x 10 ⁻¹⁰
0.00669	0.000004	1.6 x 10 ⁻¹¹
0.00666	-0.000026	6.76 x 10 ⁻¹⁰
0.00663	-0.000056	3 x 10 ⁻⁹
y _{médio} = 0.006686	Σ = 0.0	Σ = 6 x 10 ⁻⁹
Desvio padrão (RSD) = 0.0039		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.009826 ± 0.0039		

Conc. 5.012x10³

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.00750	0.000054	2 x 10 ⁻⁹
0.00747	0.000024	5.76 x 10 ⁻¹⁰
0.00745	0.000004	1.6 x 10 ⁻¹¹
0.00742	-0.000026	6.76 x 10 ⁻¹⁰
0.00739	-0.000056	3 x 10 ⁻⁹
y _{médio} = 0.007446	Σ = 0.0	Σ = 6 x 10 ⁻⁹
Desvio padrão (RSD) = 0.0039		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.009826 ± 0.0039		

1.2. Para a análise espectrofotométrica das amostras de Fansidar

1.2.1. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra A

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.0099	0.00008	6.4 x 10 ⁻⁹
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
y _{médio} = 0.00982	Σ = 0.0	Σ = 8 x 10 ⁻⁹
Desvio padrão (RSD) = 0.0011		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.00982 ± 0.0011		

1.2.2. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra A

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.0063	-0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0064	0.00	0.00
0.0064	0.00	0.00
0.0065	0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0064	0.00	0.0
y _{médio} = 0.0064	Σ = 0.0	Σ = 2 x 10 ⁻⁸
Desvio padrão (RSD) = 0.0071		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.0064 ± 0.0071		

1.2.3. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra B

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.0099	0.00008	6.4 x 10 ⁻⁹
0.0099	0.00008	6.4 x 10 ⁻⁹
0.0098	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.0099	0.00008	6.4 x 10 ⁻⁹
y _{médio} = 0.00982	Σ = 0.00020	Σ = 2 x 10 ⁻⁸
Desvio padrão (RSD) = 0.0071		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.00982 ± 0.0071		

1.2.4. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra B

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.00643	0.00	0.00
0.00645	0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
0.00643	0.00	0.00
0.00643	0.00	0.00
0.00641	-0.00002	4 x 10 ⁻¹⁰
y _{médio} = 0.00643	Σ = 0.0	Σ = 8 x 10 ⁻¹⁰
Desvio padrão (RSD) = 0.0014		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.00643 ± 0.0014		

1.2.5. Análise dos dados da Sulfadoxina na amostra C

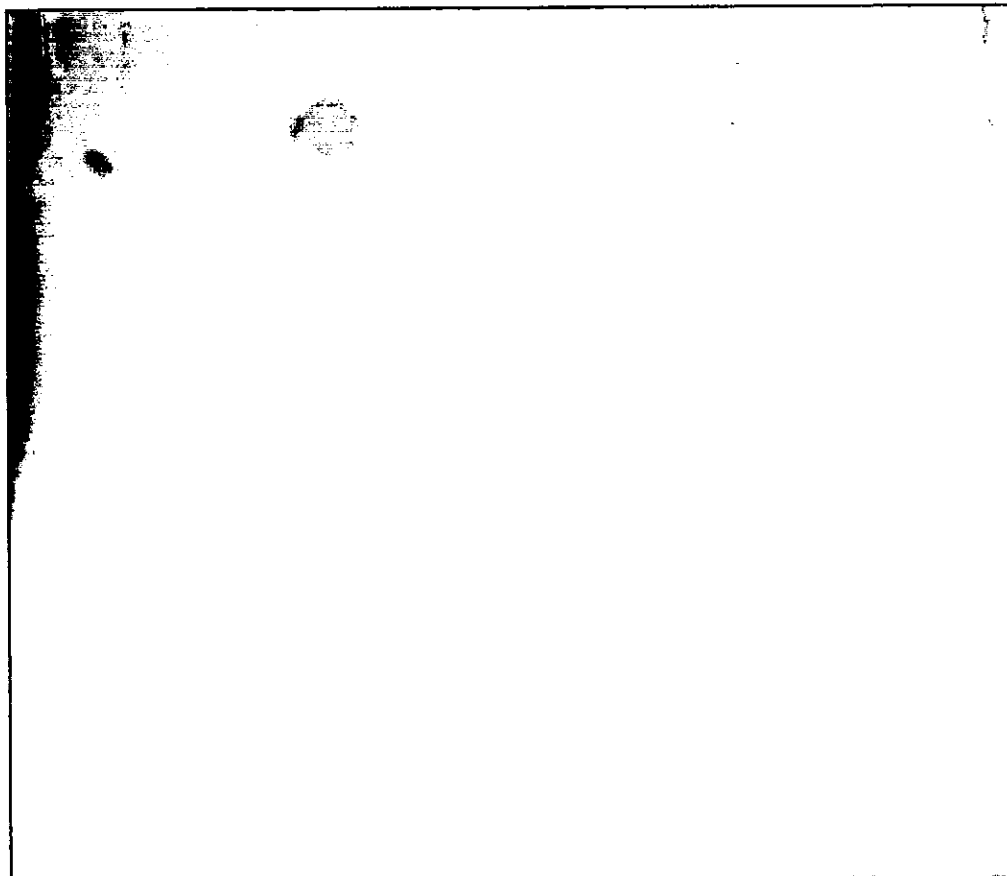
Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.0101	0.0002	4 x 10 ⁻⁸
0.0100	0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0099	0.00	0.00
0.0098	-0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0097	-0.0002	4 x 10 ⁻⁸
y _{médio} = 0.0099	Σ = 0.00	Σ = 1 x 10 ⁻⁷
Desvio padrão (RSD) = 0.016		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.0099 ± 0.016		

1.2.6. Análise dos dados da Pirimetamina na amostra C

Absorvâncias (y)	y-y _{médio}	(y-y _{médio}) ²
0.0067	0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0065	-0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0067	0.0001	1 x 10 ⁻⁸
0.0066	0.00	0.00
0.0065	-0.0001	1 x 10 ⁻⁸
y _{médio} = 0.0066	Σ = 0.0	Σ = 4 x 10 ⁻⁸
Desvio padrão (RSD) = 0.010		
Limite de confiança (y _{médio} ± RSD) : 0.0066 ± 0.010		

ANEXO 2

2. TLC de Sulfadoxina, Pirimetamina e Fansidar

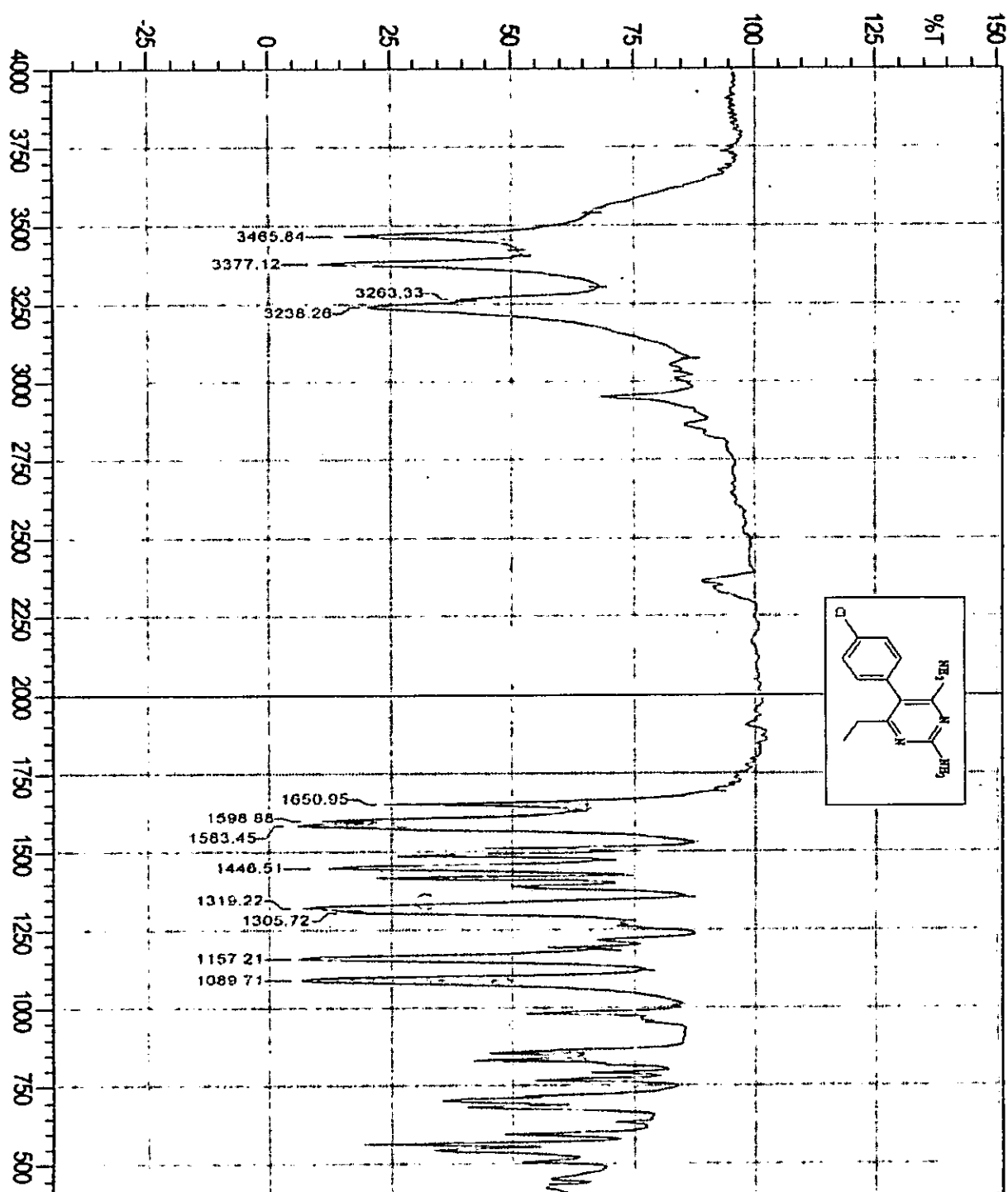


Placa: *Silica gel*
Solvente: *Acetato de etilo*
 λ de revelação: *366 nm*
S: *Sulfadoxina*
P: *Pirimetamina*
A: *Amostra de Fansidar*

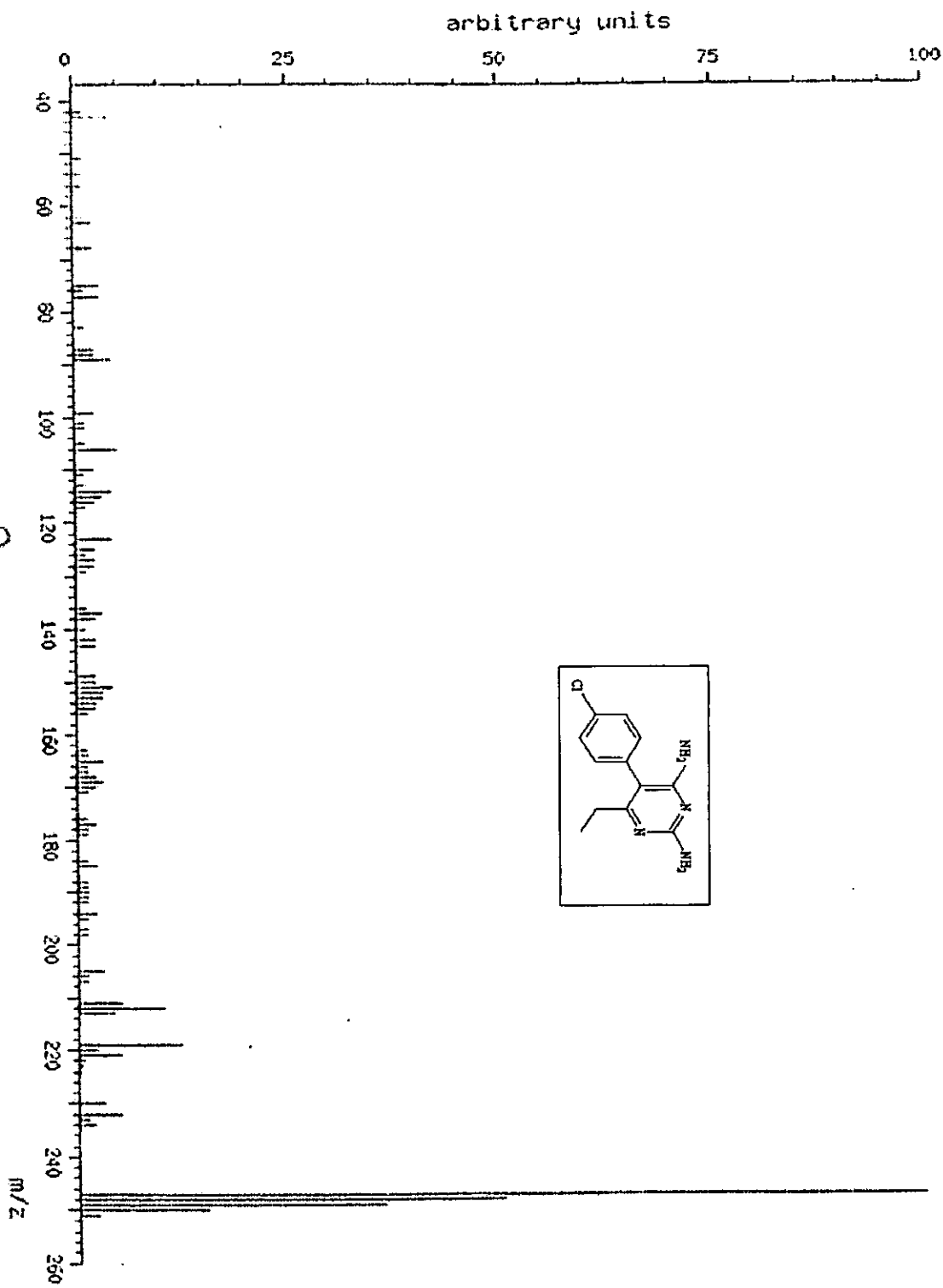
ANEXO 3

3. Espectro

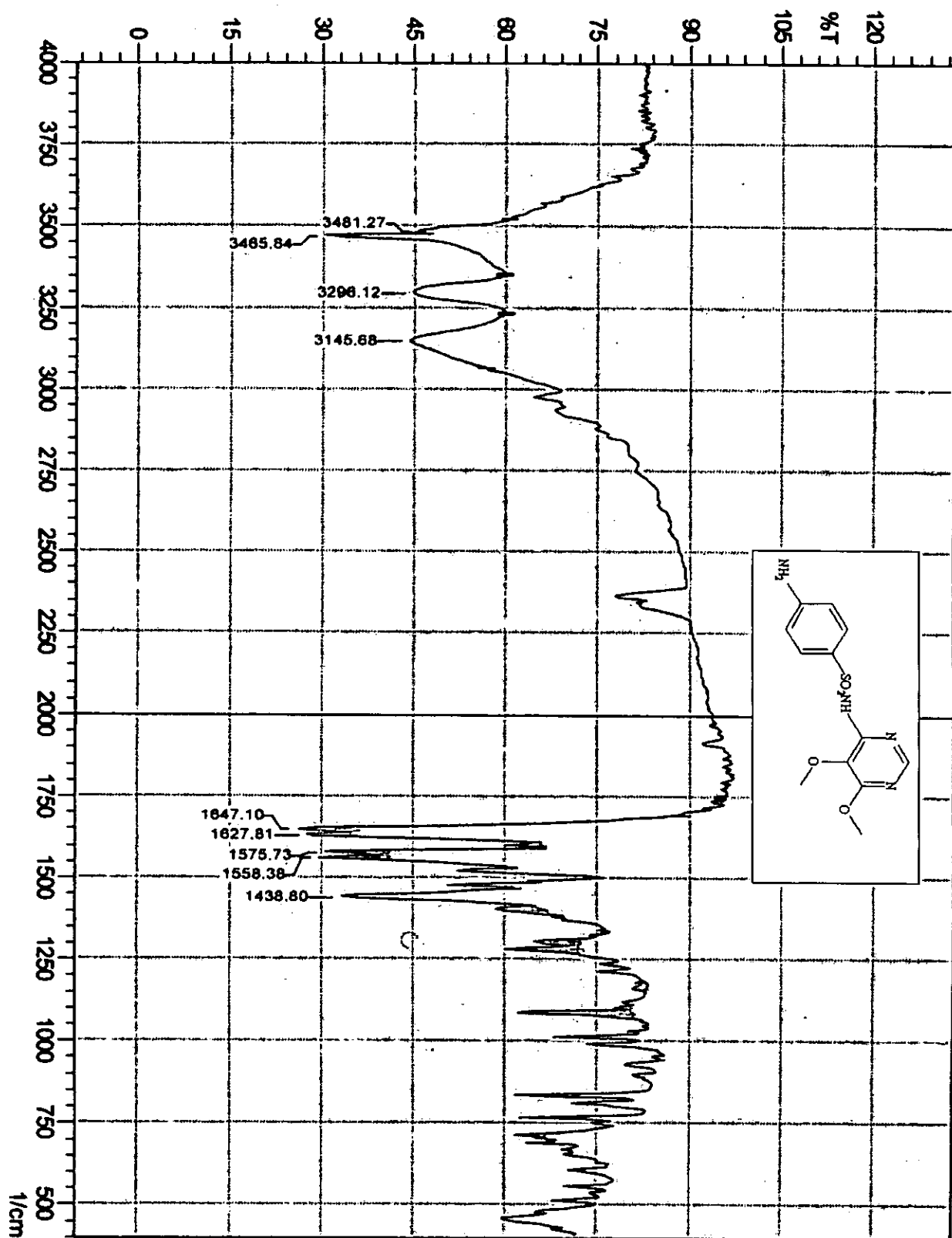
Espectro 1: Espectro de Infravermelho da Pirimetamina



Espectro 2: Espectro de Massa da Pirimetamina



Espectro 3: Espectro de Infravermelho da Sulfadoxina

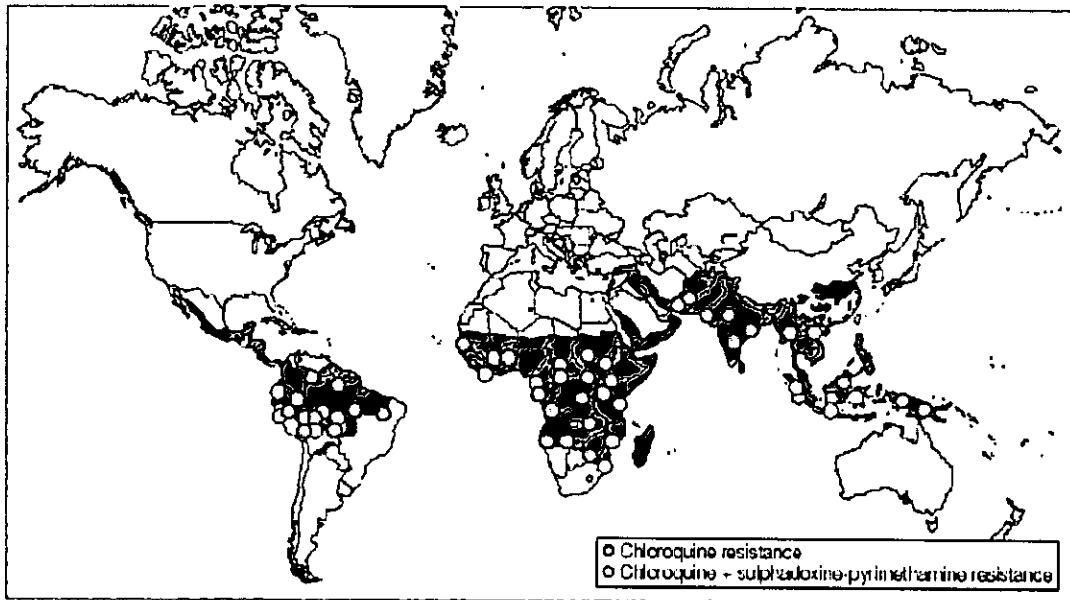


ANEXO 4

4. Anexo de figuras

A malária

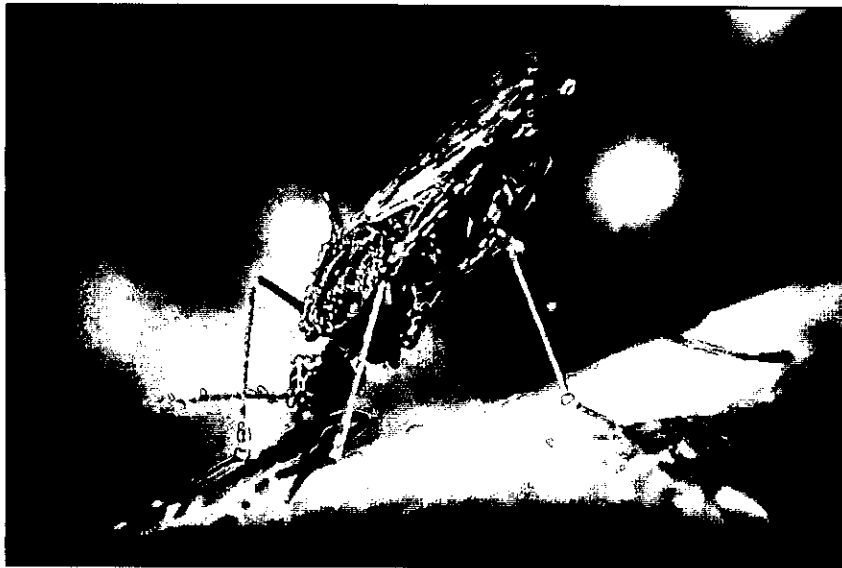
- O caos causado pela Malária no mundo:



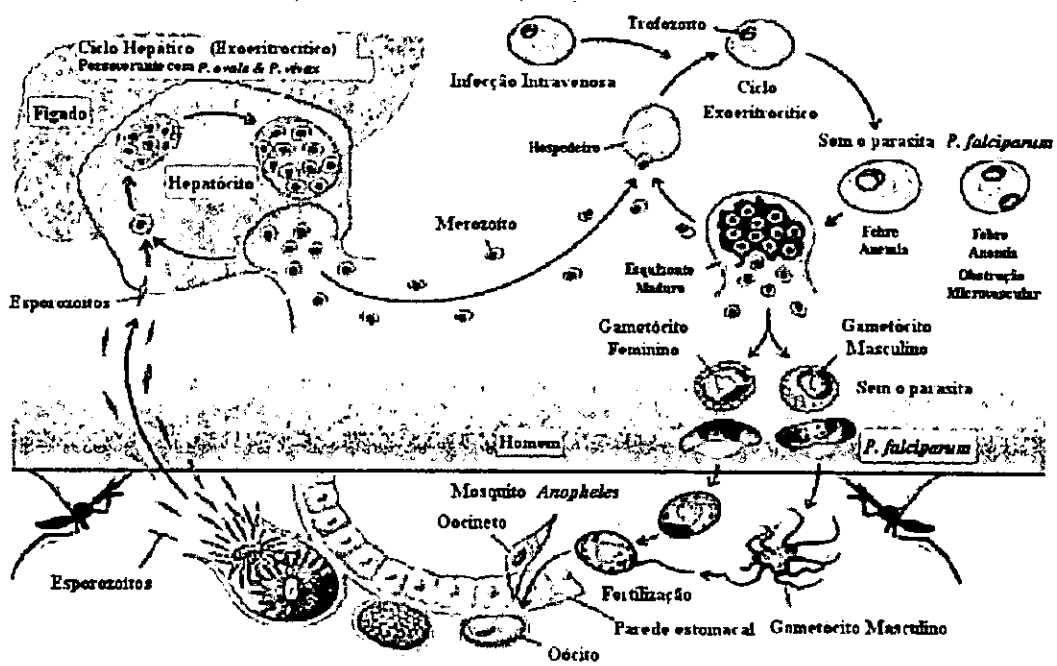
4.1) Distribuição da malária no mundo em 2005 ^[1].



4.2) Aspecto de alguns glóbulos vermelhos após a acção do *P. Falciparum* ^[1].



4.3) O mosquito do género *Anopheles* ^[3].



4.4. Ciclo de vida do parasita e local de acção dos agentes antimaláricos ^[3].

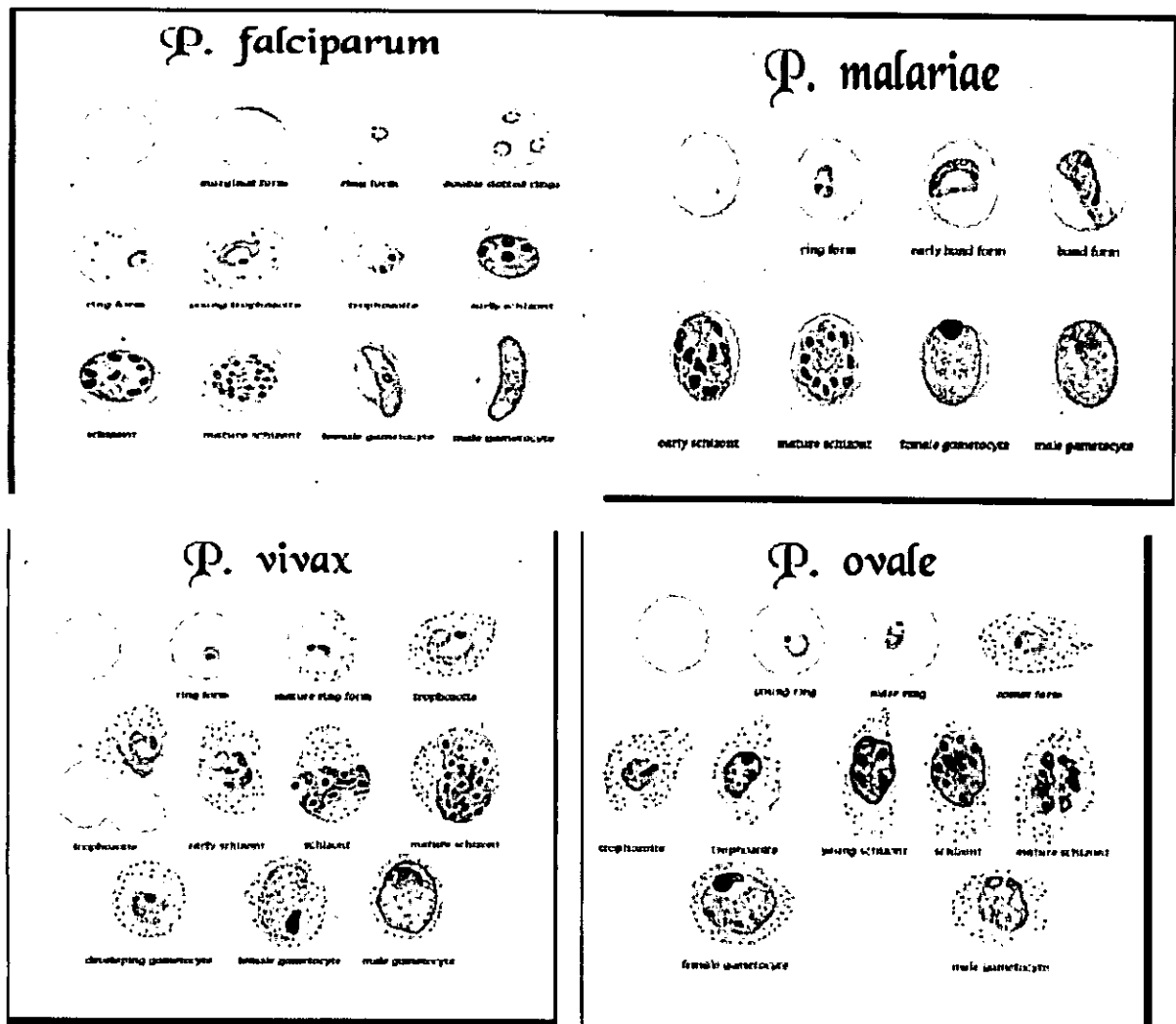


Figura 4.5. Espécies de plasmodium causadores da malária

Tabela :Classificação Científica das quatro espécies de plasmodium

Reino	<i>Protista</i>
Filo	<i>Apicomplexa</i>
Classe	<i>Aconoidasida</i>
Ordem	<i>Haemosporida</i>
Família	<i>Plasmodiidae</i>
Género	<i>Plasmodium</i>