



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROQUINA
EM SWAB NASAL E SANGUE E SUA INFLUÊNCIA NA
POSITIVIDADE DE SARS-COV2 EM PACIENTES
ATENDIDOS EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM MANAUS,
AMAZONAS, BRASIL**

CARLOS EDUARDO PADRON DE MORAIS

MANAUS
2023



CARLOS EDUARDO PADRON DE MORAIS

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROQUINA
EM SWAB NASAL E SANGUE E SUA INFLUÊNCIA NA
POSITIVIDADE DE SARS-COV2 EM PACIENTES
ATENDIDOS EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM MANAUS,
AMAZONAS, BRASIL**

Projeto de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, como requisito parcial para obtenção grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador (a): **Prof^ª Dra. Gisely Cardoso de Melo**

MANAUS

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Morais, Carlos Eduardo Padron de

Determinação da concentração de cloroquina em swab nasal e sangue e sua influência na positividade de sars-cov2 em pacientes atendidos em unidade de referência em Manaus, Amazonas, Brasil. Carlos Eduardo Padron de Moraes. Manaus, 2023. viii. 65f.

Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Melo, Gisely Cardoso de

1.Sars-CoV-2. 2. RT-PCR. 3. Cloroquina. 4. Coronavírus. 5. DesetilCloroquina

I. Melo, Gisely Cardoso de

II. Universidade do Estado do Amazonas.

III. Determinação da concentração de cloroquina em swab nasal e sangue e sua influência na positividade de sars-cov2 em pacientes atendidos em unidade de referência em Manaus, Amazonas, Brasil.

FOLHA DE JULGAMENTO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROQUINA EM
SWAB NASAL E SANGUE E SUA INFLUÊNCIA NA
POSITIVIDADE DE SARS-COV2 EM PACIENTES ATENDIDOS
EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM MANAUS, AMAZONAS,
BRASIL**

**CARLOS EDUARDO PADRON DE
MORAIS**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

AGRADECIMENTOS

Venho agradecer primeiramente à Deus, pois sem ele nada seria possível, graças a ele muitas oportunidades surgiram, é com toda força abracei a todas.

Agradecer ao Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos, por ser o primeiro pesquisador a me conceder a oportunidade de fazer parte de um grande projeto de pesquisa, a todos do laboratório por todo conhecimento passado, em especial a Jaqueline Silva de Jesus que foi a mentora responsável por todo ensinamento e paciência, a ter me orientado também no trabalho de conclusão de curso e todo seu carinho durante toda a minha jornada no laboratório de Tuberculose.

À Dra. Rossicleia Lins Monte Gerente da Bacteriologia que me proporcionou uma bolsa de estágio, para realização de atividades laboratoriais (IEL) até a conclusão do meu curso, a todas a puxadas de orelhas, toda orientação, todo carinho, todo amor como de mãe, aos ensinamentos, as atividades e desafios propostos, tudo para um crescimento profissional, a todos incentivos, mostrando que a capacidade vai muito além do que imaginamos.

Dra. Marcia da Costa Castilho e Dra. Camila Helena Aguiar Bôtto de Menezes, por terem me acolhido após o término da graduação, me dando a primeira oportunidade de desenvolver atividade em um projeto de pesquisa, como ensino superior completo.

À Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado pelas oportunidades concedidas a mim, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas pelo empenho e dedicação aos alunos do programa.

Ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda e a Dra. Gisely Cardoso de Melo, por terem proporcionado a oportunidade de fazer parte da equipe laboratorial do estudo CLOROCOVID no início da pandemia, onde todo conhecimento era escasso dada ao surgimento da nova doença.

A Dra. Gisely Cardoso de Melo, por ter aceitado me orientar, ter confiado a mim varias responsabilidades laboratoriais, todo apoio, paciência e reconhecimento profissional, por ter transmitido o máximo de conhecimento possível para o amadurecimento científico e profissional.

Às equipes envolvidas no estudo CLOROCOVID E METCOVID que desenvolveram e participaram ativamente em todo o processo, proporcionando que outras pessoas conseguissem utilizar dados e amostras para estudos futuros.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Queria agradecer também aos meus queridos colegas de trabalho, que sempre estão ao meu lado, apoiando-me, ajudando-me, e em especial a Rebeca Linhares de Abreu Netto, Dr. Victor Irungu Mwangi, por estarem ativamente me auxiliando em todo o meu projeto, desde o desenvolvimento às análises estatísticas.

À Flávia Alencar Fontenelle por toda parceria, paciência, apoio, empenho, carinho, amor, por todos os dias estar me incentivando a ser uma pessoa melhor e mais responsável, por todos os dias me aturar, onde sei que é uma das mais difíceis tarefas, e assim se finaliza de mais uma etapa, que possivelmente não conseguiria sem seu apoio incondicional.

Aos meus amigos, que sempre me aturam, apoiarem, por me fazerem juntar o balde todas as vezes que chutei, por me fazerem criar coragem de me desafiar a sempre querer o melhor e elevarem o meu ego, pela paciência de eu sumir sem dar satisfação, agradecer em especial à Vitória Silva Printes, Fabiola Rodrigues Cavalcante, Jeanne Feitoza de Andrade e Bruno Santos da Silva, que me acompanham desde a faculdade e levo essas amizades para minha vida; à Taynara Barros de Oliveira e Luís Felipe Alho da Silva, que se inseriram no meio do caminho e estamos caminhando todos juntos, apesar de todas as dificuldades e estresses.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Este estudo faz parte de um projeto maior realizado pela FMT-HVD que já possui financiamento, os membros da Equipe CloroCovid-19 foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), além do Governo do Estado do Amazonas, Farmanguinhos (Fiocruz) e Superintendência da Zona Franca de Manaus, projeto este que dará suporte técnico para o desenvolvimento e realização deste estudo. O presente estudo também contou com o apoio de bolsa de pesquisa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES) - Código Financiador 001, oriunda do Ofício Circular nº 14/2020-GAB/PR/CAPES: Ações emergenciais para imediato combate à Covid-19/Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias.

EPÍGRAFE

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

RESUMO

O vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é o agente causador da doença conhecida como COVID-19. Apesar do desenvolvimento de vacinas já aprovadas, ainda é uma ameaça à saúde pública em todo o mundo. No período pandêmico não existia um medicamento com comprovação científica contra a COVID-19, contra seus efeitos, sintomas e antivirais. O objetivo foi determinar e comparar as concentrações de CQ em sangue e swab nasal durante os dias de acompanhamento D1, D5 e D7. O estudo incluiu 41 indivíduos, seguido os critérios de inclusão: > 18 anos; hospitalizado com suspeita clínica ou epidemiológica de Covid-19; com frequência respiratória >24 irpm E/OU, frequência cardíaca > 125 bpm (na ausência de febre) e/ou, saturação periférica de oxigênio <90% em ar ambiente e/ou choque (definido como PAM<65 mmHg, com necessidade de vasopressor ou oligúria ou rebaixamento de nível de consciência), ter feito uso de cloroquina durante o acompanhamento; sem história de hipersensibilidade a cloroquina; pacientes positivos na visita de inclusão. Foi observado que apenas 26 indivíduos foram elegíveis. As médias das concentrações de CQ (desvio padrão) para amostras de swab foram: 0,3183 μ M (0.5175 μ M), 0,3215 μ M (0.4197 μ M) e 0,2369 μ M (0.1502 μ M), e nas amostras de plasma foram: 0,7382 μ M (0.9311 μ M), 5,753 μ M (2.77 μ M) e 6,181 μ M (3.594 μ M). A comparação entre as médias das concentrações de CQ em visitas de D1, D5 e D7, apenas amostras de Plasma apresentou diferença significativas (valor- p <0,0001). Análise de correlação entre concentrações de CQ vs dias de acompanhamento demonstrou correlações fortes nas amostras de swab D1 vs swab D7 ($r= 0.647$, valor- $p=0.005$), e em plasma D7 vs Swab D7 ($r=0.537$, valor- $p=0.018$), e em Swab D1 vs plasma D5 ($r= -0.489$, valor- $p=0.021$). Correlacionando as concentrações plasmáticas de CQ vs dose de CQ administrada nos dias de acompanhamento D1, D5 e D7, apenas a visita D5 apresentou correlação positiva e estatisticamente significativa ($r= 0,5876$, valor $p= 0,0025$). Correlações entre a concentração de CQ em swab vs valor de Ct, apenas as visitas de acompanhamento D1 e D5 apresentaram correlações fortes negativas e com valores estatisticamente significativo ($r= -0,6258$, valor- $p= 0,0095$) e respectivamente ($r= -0,6633$, valor- $p= 0,0515$). As correlações entre DesetilCQ e a concentração de CQ nas amostras de plasmas em todos os dias de acompanhamento apresentaram correlação e com valor significativo, no entanto para as amostras de Swab apenas a visita D7 apresentou correlação significativa. As concentrações de CQ expressaram ampla variabilidade para amostras de swab, por apresentar concentração muito baixas, possivelmente as amostras de swab não são uma boa alternativa para determinação da concentração da droga. Avaliando concentrações e a PCR, o fármaco possivelmente não foi capaz de acelerar a negativação das amostras nos dias de acompanhamento.

Palavras Chaves: COVID, Cromatografia, HPLC, DesetilCloroquina, Cloroquina, swab, plasma.

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus is the causative agent of the disease known as COVID-19. Despite the development of already approved vaccines, it is still a threat to public health worldwide. During the pandemic period, there was no medicine with scientific proof against COVID-19, against its effects, symptoms and antivirals. The objective was to determine and compare CQ concentrations in blood and nasal swabs during follow-up days D1, D5 and D7. The study involved 41 individuals, following the inclusion criteria, over 18 years old; hospitalized with clinical or epidemiological suspicion of Covid-19; and who has: respiratory rate >24 bpm AND/OR, heart rate >125 bpm (in the absence of fever) AND/OR, peripheral oxygen saturation $<90\%$ on room air AND/OR, shock (defined as MAP <65 mmHg, in need of vasopressors or oliguria or lowered level of consciousness), patients who used Chloroquine; no history of hypersensitivity to one of the drugs used in the study; positive patients at the inclusion visit, where only 26 subjects were eligible. Mean CQ concentrations (standard deviation) for swab samples were: $0.3183\mu\text{M}$ ($0.5175\mu\text{M}$), $0.3215\mu\text{M}$ ($0.4197\mu\text{M}$) and $0.2369\mu\text{M}$ ($0.1502\mu\text{M}$), and for plasma samples were: $0.7382\mu\text{M}$ ($0.9311\mu\text{M}$), $5.753\mu\text{M}$ ($2.77\mu\text{M}$) and $6.181\mu\text{M}$ ($3.594\mu\text{M}$). Comparison between mean CQ concentrations at visits on D1, D5 and D7, only Plasma samples showed significant differences (p -value <0.0001). Correlation analysis between CQ concentrations vs follow-up days demonstrated strong correlations in D1 swab vs D7 swab samples ($r=0.647$, p -value $=0.005$), and in D7 vs D7 swab samples ($r=0.537$, p -value $=0.018$), and in Swab D1 vs plasma D5 ($r=-0.489$, p -value $=0.021$). Correlating plasma CQ concentrations vs. CQ dose administered on follow-up days D1, D5 and D7, only visit D5 showed a positive and statistically significant correlation ($r=0.5876$, p -value $=0.0025$). Correlations between CQ swab concentration vs Ct value, only follow-up visits D1 and D5 showed strong negative correlations with statistically significant values ($r=-0.6258$, p -value $=0.0095$) and respectively ($r=-0.6633$, p -value $=0.0515$). The correlations between DesethylCQ and the concentration of CQ in the plasma samples on all follow-up days showed correlation and with a significant value, however for the Swab samples only visit D7 showed a significant correlation. The CQ concentrations expressed wide variability for swab samples, due to their very low concentrations, possibly swab samples are not a good alternative for pharmacokinetic determination of the drug. Evaluating concentrations and PCR, the drug was possibly not able to accelerate the negative results of the samples on the follow-up days.

Keywords: COVID, Chromatography, HPLC, DesethylChloroquine.

RESUMO LEIGO

O novo Coronavírus conhecido como SARS-CoV-2 é um vírus causador da doença chamada de COVID-19, que foi descoberta em dezembro de 2019. Por sua fácil transmissão, em um curto período de tempo se espalhou pelo mundo, sendo o responsável por causar uma pandemia declarada pela OMS, em 2020. A infecção por este vírus pode causar interações de casos leves e graves. Por ser um vírus recente ainda há necessidade de conhecer mais sobre ele e como a doença se comporta. O objetivo deste estudo foi medir a quantidade de droga presente no sangue e na secreção do nariz que foram coletadas previamente. A dosagem é medida por um equipamento chamado de Cromatografia líquida de alta eficiência, em pacientes atendidos no Hospital de referência para Covid-19 em Manaus, Amazonas, que fizeram uso de Cloroquina e que foram positivos para COVID. Os resultados mostraram que as amostras nasais não são boas para mostrar a presença da droga, e a CQ não demonstrou ter efeito contra o vírus, de acordo com o esperado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico de notificações de mortes informadas à OMS	18
Figura 2: Tabela com casos totais cumulativos de COVID-19 por 1 milhão de habitantes (15)	19
Figura 3: Coleta de swab nasofaringe/orofaringe (74)	30
Figura 4: (Figure 1) Fluxograma dos participantes do estudo	35
Figura 5: (Figure 2) Gráfico de tendência do valor do limiar do ciclo (Ct) de PCR em pacientes com sintomas por menos ou mais de 7 dias antes da admissão.....	39
Figura 6: (Figure 3) gráficos de concentração de CQ em amostras analisadas em dias de acompanhamento (média [DP])	40
Figura 7: (figure 4) correlação das doses administradas vs concentração plasmática; (A) gráfico de correlação nas amostras D1; (B) gráfico de correlação nas amostras D5; (C) gráfico de correlação em amostras D7.	41
Figura 8: (Figure 5) Correlação do valor de Ct vs concentração de CQ em Swab's; (A) gráfico de correlação nas amostras D1; (B) gráfico de correlação nas amostras D5; (C) gráfico de correlação em amostras D7.....	42
Figura 9: (figure 6) Correlação da concentração plasmática de CQ na visita D7 vs dose cumulativa ingerida.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas de 26 pacientes atendidos no HPSDRA, em abril de 2020.....	37
Tabela 2: História clínica e médica dos pacientes no início do estudo.....	38
Tabela 3: Histórico médico dos pacientes nas características basais.....	38
Tabela 4: Dose média de CQ ingerida pelos participantes para cada kg.....	39
Tabela 5: Positividade da PCR nos grupos maiores e menores de 7 dias de sintomas.....	40
Tabela 6: Concentração de CQ em amostras de Swab e plasma (média [DP]), dias de acompanhamento; comparação das médias de concentração de CQ com dia correspondente e resultado de PCR (<i>p</i> -valor)	41
Tabela 7: Correlação da concentração de DesetilCQ em amostras de plasma versus concentração de CQ para ambas as amostras em dias diferentes.....	43
Tabela 8: Correlação entre Comorbidades e a concentração de QC em amostras de plasma.	44
Tabela 9: Correlação entre Comorbidades e a concentração de QC em amostras de Swabs.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACE2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2
- CDC – Centro de controle e prevenção de Doenças da China
- CGIA – testes rápidos de diagnóstico (ensaios de fluxo lateral)
- CLIA – ensaio de quimioluminescência
- CoV – Coronavírus
- CQ - cloroquina
- CT – limiar de ciclos
- CYP450 – citocromo P450
- DCQ – desetilcloroquina
- ELIZA – ensaios imunoabsorção enzimática
- FIA – imunocromatográficos marcados com fluorescência
- FIOCRUZ-Amazonas - Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane ,
Manaus, Brasil
- FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus,
Brasil
- FVS – fundação de vigilância em Saúde
- HCQ – hidroxicloroquina
- HPCL – cromatografia líquida de alta eficiência
- IG – imunoglobulina
- JHU – universidade Johns Hopkins
- LIPS – sistema de imunoprecipitação
- MERS – Síndrome respiratória do Oriente médio
- OMS - Organização mundial da saúde
- PCR – reação em cadeia da polimerase
- PPGMT - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
- Proteína S - Proteína Spike
- RT-PCR - transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
- SARS – Síndrome respiratória aguda grave
- SE – Semana Epidemiológica
- UEA - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

μM – microMol
mg - miligrama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Aspectos Gerais	17
1.2. Epidemiologia do SARS-CoV-2	18
1.3. Diagnóstico de SARS-CoV-2.....	19
1.3.1. Testes Rápidos	20
1.3.2. Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)	21
1.4. Tratamento de SARS-CoV-2.....	22
1.4.1. Cloroquina	22
1.4.2. Farmacocinética Da Cloroquina	23
2. OBJETIVO	26
1.1 GERAL.....	26
1.2 ESPECÍFICO.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODO	27
3.1. Desenho Do Estudo:	27
3.2. Aspectos Éticos:	27
3.3. População De Referência:	27
3.4. Critérios de Inclusão:.....	27
3.5. Critérios exclusão:	28
3.6. Procedimentos laboratoriais	28
3.6.1. Coletas De Amostras De Plasma	28
3.6.2. Coletas de amostras de Swab orofaringe/nasofaringe	28
3.6.3. Dosagem De Cloroquina	29
3.6.4. Detecção e Quantificação Do Vírus	29
4. Análise Estatística.....	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Produto da dissertação	31
6. CONCLUSÃO.....	2
7. LIMITAÇÕES	3
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
9. ANEXOS E APÊNDICES.....	9
9.1. Parecer ético	9

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

Os Coronavírus (CoV) foram descobertos há cerca de 60 anos, porém apenas em 2003 foi detectado como agente etiológico causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (1).

SARS surgiu no Sul da China entre 2002/2003 e esse espalhou rapidamente pelo mundo (2,3). Em 2012, ocorreu a descoberta da Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) também causada por um CoV (4). Ambos tiveram transmissibilidade comprovada de animais para humanos (2,5).

Os CoV são detectados em uma diversidade de animais, podendo causar inúmeras doenças, dentre elas: doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (6). Achados demonstraram que o CoV que infecta o Morcego (bat-SARS-CoV) está intimamente relacionado ao genoma do SARS-CoV que infecta humanos e Civeta (7). O novo CoV que foi identificado em 2019, foi nomeado 2019-nCoV (8,9).

São sete os Coronavírus que infectam humanos, dentre eles inclui-se o mais recentemente descoberto, SARS-CoV-2. Além dele temos: os Coronavírus humano HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 ou HCoV-HKU1 causam apenas resfriados comuns (10), o SARS-CoV e o MERS-CoV podem causar infecções mais graves, apresentando uma mortalidade alta (11–13). O SARS-CoV-2, que é o novo membro dos betacoronavírus, está causando uma situação alarmante no cenário mundial, ganhando notoriedade (9).

Em 2019, O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) da China relatou casos de pneumonia com causa desconhecida, ocorrido em Wuhan. No dia 20 de janeiro de 2020 mais de 200 casos de pneumonia foram confirmados. Após investigação da equipe, em 03 de janeiro de 2020 o Genoma completo do novo CoV foi identificado em amostra de lavado bronco alveolar (14).

1.2. Epidemiologia do SARS-CoV-2

Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou que a epidemia da COVID-19 constituía uma emergência de saúde pública de importância internacional. Até 21 de março de 2023, houve 761.071.826 casos confirmados, incluindo 6.879.677 mortes, notificados à OMS. Até 21 de março de 2023, um total de 13.260.401.200 doses de vacina foram administradas (15).

As Américas ocupam o terceiro lugar com um total de 191.185.511 casos confirmados, atrás apenas da Europa (274.391.717 casos) e Pacífico Ocidental (201.913.013 casos), respectivamente. No entanto, as Américas superam a Europa em número de mortes, com 2.939.388 notificados até 21 de março de 2023 Figura 1(15).

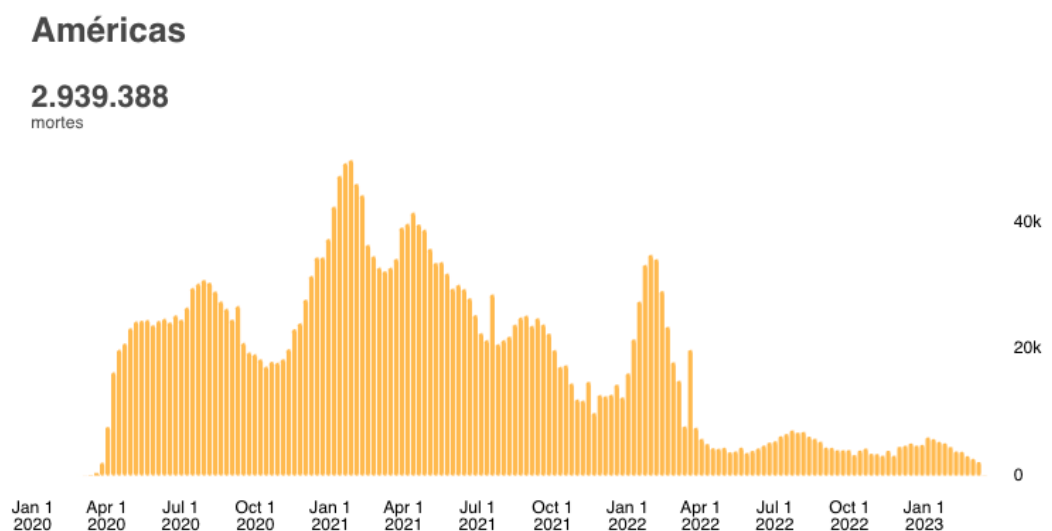


Figura 1: Gráfico de notificações de mortes informados à OMS (15).

No Brasil, o primeiro caso confirmado foi em 26 de fevereiro de 2020 na cidade de São Paulo e o paciente possuía histórico de viagem para Itália (16). De 03 de janeiro de 2020 à 21 março de 2023, houve 37.14.514 casos confirmados de COVID-19 com 699.634 mortes, e ocupa o segundo lugar no mundo de mortes cumulativas com um total de 699.634 mortes Figura 2 (15).






Situação por região, país, território e área							
Nome	Casos - total cumulativo	Casos - notificados recentemente nos últimos 7 dias	Óbitos - total acumulado	Mortes - relacionadas recentemente nos últimos 7 dias	Doses totais de vacina administradas por 100 habitantes	Pessoas totalmente vacinadas com a última dose da série primária por 100 habitantes	Pessoas impulsionadas por 100 habitantes
Global	761.071.826	657.841	6.879.677	4.338	170,12	65,25	30,96
 Estados Unidos da América	102.544.598	126.613	1.114.970	1.741	200,82	68,72	34,99
 Brasil	37.145.514		699.634		238,05	79,94	51,59
 Índia	44.696.984	5.646	530.808	24	159,89	68,99	16,57
 Federação Russa	22.525.882	82.995	396.899	235	127,7	54,54	
 México	7.511.450	13.991	333.327	28	173,08	63,48	44,22

Figura 2: Tabela com casos totais cumulativos de COVID-19 por 1 milhão de habitantes (15).

De acordo com boletim epidemiológico, o Estado do Amazonas registrou 624.864 casos e 14.418 óbitos registrados; ocorrendo 201.381 casos e 419 óbitos apenas em 2022 (17). No Amazonas dados de 20 de março de 2023, foram notificados 1.878.940 casos, onde a capital foi responsável por 1.060.309 deste casos e o interior com 818.631 casos, a letalidade do estado foi 2,28% (18).

1.3. Diagnóstico de SARS-CoV-2

Em 2003, o SARS-COV foi isolado em cultura e seu material genético foi obtido através de um procedimento de amplificação aleatória baseado em reação de cadeia da polimerase (PCR) (3,20). Drosten *et al.*, encontraram que o RNA viral também foi detectado em concentrações extremamente baixas no plasma durante a fase aguda (20). O diagnóstico do SARS-CoV é realizado através de teste moleculares de transcriptase reversa, como: RT-PCR convencional, RT-PCR em tempo real entre outros (21). No diagnóstico sorológico, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) pode ser realizado (22,23).

De acordo com o CDC, estão disponíveis dois tipos de testes: testes moleculares (PCR) e teste de anticorpos (24,25). O teste molecular é realizado pelo PCR em tempo real, que é o padrão ouro para o diagnóstico da infecção (24,25). Teste de anticorpos não

devem ser usados para o diagnóstico de uma infecção atual, pois pode levar de 1 a 3 semanas para o corpo começar a produzir anticorpos contra a infecção (24,25).

Vários estudos avaliaram sensibilidade e especificidade de diferentes testes e métodos para o diagnóstico de SARS-CoV2, dentre os ensaios sorológicos temos: Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoenensaio por quimioluminescência (CLIA) e outros métodos como, testes de imunofluorescência indireta (IIFT) e sistema de imunoprecipitação de luciferase (LIPS). E para os testes rápidos de diagnóstico, inclui-se ensaios de fluxo lateral, que são os ensaios de ouro coloidal (CGIA) ou imunocromatográficos marcados com fluorescência (FIA) (26).

1.3.1. Testes Rápidos

Teste rápido é definido como um dispositivo de testes de uso único que independe de infraestrutura laboratorial, cujo resultado deve ser liberado com um tempo menor a 30 minutos, e essa variação é predefinida pelo fabricante. O procedimento consiste em uma gota de amostra colocada no dispositivo seguindo de orientações do fabricante (27).

Teste rápido é baseado na técnica de imunocromatografia de fluxo lateral, que seu resultado é expresso de forma qualitativa, demonstrando se o indivíduo está expressando ou não anticorpos Imunoglobulina (Ig), podendo ser IgA, IgG e/ou IgM (28). Os testes de imunocromatografia além de avaliar anticorpos, foram desenvolvidos para detecção rápida de antígeno, e seu desempenho mostrou sensibilidade de 87% e especificidade de 96%, esses testes podem agregar melhorias nas estratégias de testagens e especialmente em lugares com recursos limitados (29).

De acordo com Albert *et al.* avaliando teste rápido de antígeno comercial, demonstrou uma sensibilidade de 79,6% e especificidade de 100%, usando como controle RT-PCR, o teste teve bom desempenho e seria um ótimo auxiliar para o diagnóstico precoce da COVID-19 (30).

Testes sorológico/imunológicos podem contribuir para um diagnóstico complementar, porém precisa-se trabalhar com cautela, pois existem limitações. O tempo de resposta do corpo na produção de anticorpos contra o SARS-CoV2. Determinados testes sorológicos podem apresentar reações cruzadas com outros CoV, que pode expressar resultados falso positivos, excepcionalmente, alguns indivíduos não apresentam

níveis de anticorpos suficiente para detecção após uma infecção. Os testes sorológicos não apresentam se a presença ou não de uma infecção ativa do SARS-CoV2 (28).

1.3.2. **Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)**

A OMS recomenda a utilização da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para todos os casos suspeitos de SARS-CoV-2, realizado através de amostras do trato respiratório superior (nasofaríngea e orofaríngea). Caso os suspeitos negativem em amostras do trato superior, sugere que seja feita a coleta de amostras do trato inferior (expectoração ou aspirado endotraqueal/lavado de broncoalveolar em pacientes com ventilação mecânica) (31).

O RT-qPCR oferece alta sensibilidade e a possibilidade de analisar múltiplos marcadores. Tendo como alvo alguns diferentes genes do SARS-CoV-2, como o gene RNA polimerase (RdRP), gene nucleocapsídeo (N), gene envelope (E), gene spike (S) e regiões ORF1b ou ORF8 (32,33). Dentre esses componentes do genoma, os genes E e N possuem uma sensibilidade maior, e então recomendou o gene E como alvo durante a triagem, seguindo de um teste confirmatório com o gene RdRP (32,34)

Incluir dois ou mais genes no ensaio de RT-qPCR pode diminuir as probabilidades de um falso negativo. No entanto, realizar testes confirmatórios com mais genes SARS-CoV-2 seria trabalhoso e demorado, tornando inviável em meio a um cenário de crescente números de casos suspeitos no mundo todo. Além do mais, apesar da alta sensibilidade do ensaio RT-qPCR para casos ativos de SARS-CoV-2, o RNA viral torna-se detectável após cerca de 3-5 dias após a contaminação, e ficando quase indetectável 14 dias após a doença (32,33).

Wang *et al.*, demonstraram que as amostras respiratórias tiveram maior positividade, em comparação as amostras de sangue, onde apenas em 1% foi positiva, e as amostras de urina, onde não houve detecção do vírus. Em contrapartida, amostras de Swabs nasais tiveram valor de CT mais baixo em relação às outras amostras, indicando cargas virais mais elevadas (35).

Schwierzeck *et al.*, compararam valor de CT em pacientes positivos para infecção por SARS-CoV-2 que apresentavam sintomas ou não, e relataram que em pacientes

sintomáticos o valor de CT foi mais baixo comparados aos assintomáticos, indicando um carga viral aproximadamente 200 vezes maior (36).

A carga viral pode ser determinada pelo valor limiar de ciclos (CT) (37), onde quanto maior o número de ciclos, menor é a quantidade de material genético do vírus, ou seja, sua carga viral é pequena, enquanto que, o CT baixo indica elevadas cargas virais, que podem ser usadas como um indicador de transmissibilidade da doença (8,38).

1.4. Tratamento de SARS-CoV-2

Em 2020, Ahsan *et al.*, descreveram alguns tratamentos contra o SARS-CoV-2: Interferon- α (IFN- α) (39–42), Interferon- β (IFN- β), Lopinavir/ritonavir (39–41,43), Favipiravir (44,45), Remdesivir (46,47), Umifenovir (48), Darunavir (49,50), Sarilumab, Cloroquina/Hidroxicloroquina e Plasma convalescente, alguns desses sendo associados a antibióticos como azitromicina e ceftriaxona (51).

Em 2021, Chilamakuri, descreve outras potenciais abordagens terapêuticas e de medicamentos, onde temos: Galidesivir, Ribavirina, Sofosbuvir, Nelfinavir, Atazanavir, arbidol, APNO1, Ivermectina, entre outros (52). A plitidepsina está se demonstrando um sintético eficaz como inibidor da cadeia de reprodução viral, atuando como bloqueador da proteína eEF1A, presente nas células humanas, que é utilizada pelo SARS-CoV-2 como receptor para a invasão celular (53).

Atualmente, no Brasil, temos 6 medicamentos aprovados pela Agência nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento da COVID-19: Remdesivir Sotrovimabe, Baricitinibe (54–57), Evusheld (cilgavimabe + tixagemabe) (58), Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir) (59) e Molnupiravir (59) (60).

1.4.1. Cloroquina

A cloroquina (CQ) é uma 4-aminoquinolina indicada para profilaxia e tratamento de malária causada por *Plasmodium sp.* Com rápida atividade esquizontocida e gametocitocida. Além da sua função antiparasitária, a cloroquina possui ação antipirética e anti-inflamatória (61–63).

O sulfato de hidroxicloroquina (HCQ), é um derivado da cloroquina que foi sintetizado em 1946 após a adição de um grupo hidroxila em um dos grupos N-etil do fosfato de cloroquina. Essa alteração foi feita com o objetivo de reduzir significativamente a toxicidade da cloroquina, de forma a não perder seu potencial de ação, o que resultaria em uma vantagem terapêutica (64).

Tanto a cloroquina quanto a hidroxicloroquina possuem ação antiviral com uma ampla gama de atividades (47,65,66). Essas drogas podem prejudicar a replicação de vários vírus ao inviabilizar a invasão celular por endocitose ou impedindo o término da replicação de vírus envelopados (65). Dito isso, a cloroquina e seu derivado, poderiam inibir a entrada do SARS-CoV por alteração da glicosilação do receptor Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e da proteína Spike (proteína S) (67).

Em 2004, Keyaerts *et al.*, relataram a cloroquina como um inibidor eficaz da replicação do SARS-CoV *in vitro*, que pode ser considerado para o uso imediato na prevenção e tratamento de infecções para o SARS-CoV (68). Em 2008, Wang *et al.*, sugeriram a cloroquina como primeira droga com potencial para tratamento de COVID, com realização de testes *in vitro*, mostrando ter eficiência no bloqueio à infecção viral (47). Em ambos os estudos, foi necessário concentrações altas para o efeito antiviral (47,68). Já em 2020, Liu *et al.* demonstraram o potencial da hidroxicloroquina como intervenção medicamentosa para infecções por SARS-Cov-2. Contudo, apontaram também a necessidade de ensaios clínicos que precisam ressaltar os efeitos da HCQ após uso prolongado, levando em consideração a possibilidade de overdose e efeitos tóxicos, mesmo que essa seja menos tóxica que a CQ (66).

Borba *et al.* (2020) realizou a comparação entre dois braços de estudo, um foi tratado com cloroquina 450 mg duas vezes ao dia no primeiro dia e depois uma vez ao dia por 4 dias, e o outro grupo recebeu uma dose maior de 600 mg duas vezes ao dia por 10 dias, ambos os grupos em associação com azitromicina e oseltamivir. Com isso foi observado que a dose alta de cloroquina não foi segura para serem vistos benefícios nesse tratamento, não sendo recomendado novamente para casos de COVID-19, especialmente em pacientes mais velhos com doenças cardíacas pré-existentes (69).

1.4.2 Farmacocinética Da Cloroquina

A CQ possui uma farmacocinética complexa, com uma absorção rápida que leva ao pico plasmático em 1 a 3 horas. Essa rápida absorção é determinada pela velocidade de distribuição e não pela eliminação (61). A farmacocinética, os efeitos fisiológicos, a estrutura química, os mecanismos de ação e a metabolização da cloroquina e hidroxiclороquina são todos semelhantes (66,70), além do grande volume de distribuição e a longa meia-vida (72 a 120 horas), que são características de ambas as drogas (61,64,71).

O metabolismo dessas drogas ocorre no fígado, sendo mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) por meio de desalquilação. O produto dessa metabolização para ambas as drogas é a desetilcloroquina, enquanto que a desetilhidroxiclороquina é um produto apenas da hidroxiclороquina. A partir disso, ambas as drogas geram a bisdesetilcloroquina como metabólito, além disso sua excreção ocorre de forma lenta na urina. (61,64,71).

Gustafsson *et al.* (1987) demonstrou que, após 10 semanas de ingestão do fármaco, havia recuperação total de 39-67% da cloroquina administrada, e que o metabólito desetilcloroquina foi responsável por 10-16% dessa recuperação (72). A desetilcloroquina pode ser rapidamente detectada no sangue e plasma, e suas concentrações diminuem de forma lenta (72-74). Tanto a cloroquina quanto a desetilcloroquina podem ser detectadas na urina por mais de um ano após a última dose. Isso ocorre, pois a cloroquina e seus metabólitos são eliminados de forma muito lenta, possuindo meias-vidas terminais de 50 a 60 dias (72). As concentrações de bisdesetilcloroquina no sangue são de cerca de 2 a 5% das concentrações de cloroquina, após dose única (75).

Cordonnier *et al.* (1987) analisaram concentrações em indivíduos saudáveis de disopiramida na saliva e no plasma após ingestão de dose única de 100mg de disopiramida, e demonstraram concentrações que variaram de 0.07µg/ml à 1.08 µg/ml (76).

Sankowski *et al.* (2022) avaliou concentrações de terifinomida, em indivíduos que estavam utilizando 15 – 20mg de leflunomida diário para tratamento de artrite reumatóide ou artrite psoriática, onde apresentaram as concentrações em saliva repouso 72ng/mL (DP= 58) e para saliva estimulada 96ng/mL (DP=64) (77).

Ahn *et al.* (2020) encontraram concentrações de HCQ em amostra de soro e saliva: 280 µg/L (0,84 µmol/L) e 4.890 µg/L (14,7 µmol/L), respectivamente (78). Cochin *et al.* (2022) realizou análise nas concentrações de hidroxicloroquina em amostras de tecido pulmonar e plasma de hamster, onde foi administrado azitromicina (AZM) e HCQ, com duas combinações de HCQ-AZM (5 e 10 µM) e HCQ sozinho (5 e 10 µM), no grupo de HCQ + AZM para alta dose as amostras pulmonares apresentaram 17,3µg/g ± 3,51µg/g, para plasma 0,21µg/mL ± 0,08µg/mL; para o grupo de baixa dose as amostras pulmonares foi de 18,53µg/g ± 4,32µg/g, para plasma 0,15µg/mL ± 0,07µg/mL; para grupo de HCQ sozinho para alta dose as amostras pulmonares apresentaram 15,4µg/g ± 6,07µg/g, para plasma 0,12µg/mL ± 0,02µg/mL; para o grupo de baixa dose as amostras pulmonares foi de 14,1µg/g ± 3,03µg/g, para plasma 0,07µg/mL ± 0,02µg/mL (79).

COVID-19 é uma doença reemergente que se espalhou pelo mundo, causando grande impacto nos dias atuais. No período pandêmico, houve uma movimentação mundial para o seu combate. Dentre as drogas testadas está a cloroquina que foi uma das mais utilizadas ao redor do mundo devido outro estudo ter demonstrado efeito antiviral *in vitro*, onde descreveram as possíveis ligações que a droga faz nos receptores para inibir a entrada nas células, interrompendo seu ciclo de replicação.

Estudos de detecção viral demonstraram que amostras de Swab continham maior carga viral e detectam a presença do vírus por um tempo mais longo e sendo considerado período de transmissão. Além disso outros estudos demonstraram que amostras de saliva poderiam ser uma alternativa para monitoramento das concentrações de drogas, atualmente são escassas as informações farmacocinéticas em amostras de Swab.

Diante do presente estudo, contribuiremos para melhor compreensão sobre a concentração de cloroquina e Desetilcloroquina e sua influência na positividade do SARS-CoV-2, além de avaliar uma possível amostras alternativa para análises farmacocinéticas. Esse presente estudo vem para preencher lacunas e elucidar questões ainda existentes sobre o novo coronavírus.

2. OBJETIVO

1.1 GERAL

Avaliar a concentração de cloroquina em swab nasal e sangue e sua influência na positividade de SARS-COV2.

1.2 ESPECÍFICO

- Determinar a concentração de cloroquina na amostra de Swab orofaringe/nasofaringe nas visitas D1, D5 e D7.
- Determinar a concentração de cloroquina na amostra de plasma nas visitas D1, D5 e D7.
- Comparar concentração de cloroquina em amostras de Swab orofaringe/nasofaringe e plasma.
- Verificar se existe associação de concentração de cloroquina no Swab orofaringe/nasofaringe e plasma com a positividade de SARS-CoV-2.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Desenho Do Estudo:

Tratou-se de um estudo de coorte, retrospectiva de pacientes com síndrome respiratória aguda, no âmbito do novo coronavírus (SARS-CoV-2).

3.2. Aspectos Éticos:

Este estudo está atrelado a um estudo maior submetido ao CEP via Plataforma Brasil, e foi aprovado sob o CAAE No. 39745120.1.0000.0005.

3.3. População De Referência:

As amostras foram selecionadas de um projeto maior, de nome “Estudo de fase IIb para avaliar eficácia e segurança do difosfato de cloroquina no tratamento de pacientes hospitalizados com síndrome respiratória grave no âmbito do novo coronavírus (SARS-CoV-2): um ensaio clínico, duplo-cego, randomizado” (69). As amostras analisadas foram coletadas durante esse estudo (abril-Julho/2020).

3.4. Critérios de Inclusão:

- Idade acima de 18 anos;
- Hospitalizados com suspeita clínica ou epidemiológica de Covid-19;
- E que apresentaram:
 - Frequência respiratória >24 irpm E/OU
 - Frequência cardíaca > 125 bpm (na ausência de febre) E/OU
 - Saturação periférica de oxigênio <90% em ar ambiente E/OU
 - Choque (definido como PAM<65 mmHg, com necessidade de vasopressor ou oligúria ou rebaixamento de nível de consciência)
- Pacientes que fizeram uso de cloroquina;

- Sem história de hipersensibilidade a um dos medicamentos utilizados no estudo.
- Pacientes positivos na visita de inclusão

3.5. Critérios exclusão:

- Retirarem consentimento.
- Opinião do investigador, com base na avaliação de riscos e benefícios do estudo.
- Pacientes que estavam negativos nas amostras de inclusão.
- Sem amostras para análise na amostra de inclusão;

3.6. Procedimentos laboratoriais

3.6.1. Coletas De Amostras De Plasma

Foram coletadas amostras de sangue em tubos de EDTA, nas visitas de D1, D5 e D7 onde foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e mantidas sob refrigeração até a separação das alíquotas do plasma. Após o processamento as amostras foram transportadas em caixas térmicas, com controle de temperatura, para o armazenamento no ultrafreezer a -80°C.

3.6.2. Coletas de amostras de Swab orofaringe/nasofaringe

Para cada coleta, foram utilizados 3 Swabs de rayon com haste flexível (1° Narina direita; 2° Narina esquerda; 3° Orofaringe), onde foram introduzidos em movimentos rotatórios até a região faríngea (Figura 3) e submergidos em um único tubo cônico de tampa rosqueável do tipo falcon contendo 5 mL de Solução salina ou PBS 1X.

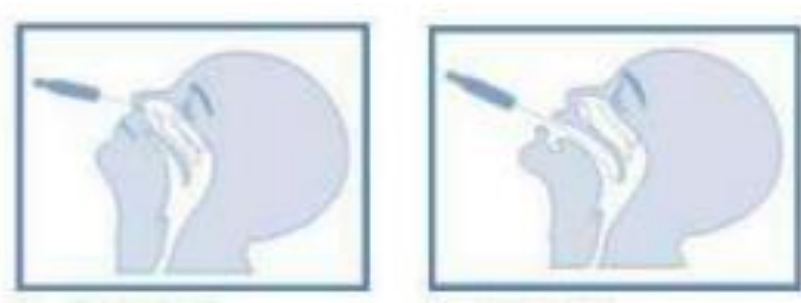


Figura 3: Coleta de swab nasofaringe/orofaringe (80)

Após a coleta foram agitados no vórtex para que o material fosse liberado na solução salina, e foram mantidos em refrigeração. Após o processamento foram transportadas em caixas térmicas, com controle de temperatura, para o armazenamento no ultrafreezer a -80°C .

3.6.3. Dosagem De Cloroquina

Foi utilizado o método descrito por Dua *et al.* (1999), que é realizado através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (51). A avaliação foi realizada com 200 μL de plasma das visitas dos: D1, D5 e D7 para a dosagem de cloroquina (CQ) e Desetilcloroquina (DCQ).

3.6.4. Detecção e Quantificação Do Vírus

Foram utilizadas amostras de Swab orofaringe/nasofaringe. As amostras foram submetidas a extração do RNA viral utilizando a plataforma Abbott 2000sp (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA), seguindo protocolo definido pelo fabricante. A detecção do SRAS-CoV-2 foi realizada através do kit comercial BiomolOneStep/COVID-19 (Instituto de Biologia Molecular di Paraná, Curitiba, PR, Brasil), e seu processamento para obtenção do resultado no equipamento 7500 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems®) (81).

4. Análise Estatística

Todos os testes tiveram nível de confiança de 95% e a rejeição da hipótese nula se deu caso o p-valor calculado para cada um dos testes mencionados seja menor que

0,05. Para comparar as concentrações da CQ durante o seguimento entre as amostras de plasma e Swab oronasofaringe/nasofaringe de CQ foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas. Para comparar média de CQ entre as amostras dos participantes estudados foi utilizado o teste T-Student ou Mann-Whitney. Para comparar as concentrações da CQ e DCQ durante o seguimento entre as amostras de plasma e Swab oronasofaringe/nasofaringe de CQ foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas. Para comparar média de CQ entre as amostras dos participantes estudados foi utilizado o teste T-Student ou Mann-Whitney. Foram realizadas análises multivariadas com modelos de regressão logística ou linear generalizada log binomial. Os dados foram analisados usando-se o programa Stata versão 16 e Prisma versão 9.0.

5. RESULTADOS

5.1. Produto da dissertação

A seguir está o principal manuscrito produto desta dissertação, o qual pretendemos submeter à revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”. O manuscrito foi elaborado considerando o formato solicitado pela revista.

Determination of chloroquine concentration in nasal Swab and Blood and its influence on SARS-CoV2 positivity in patients customized at a reference unit in Manaus, Amazonas, Brazil

Carlos E. Padron de Morais^{1,2}, Rebeca Linhares de Abreu Netto¹, Victor Irungu Mwangi¹, Flavia A. Fontenelle², Marcus V. G. Lacerda^{1,2,3}, Fernando Fonseca de Almeida e Val^{1,2}, Vanderson de Souza Sampaio^{1,2}, Gisely Cardoso de Melo^{1,2*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ² Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazil, ³ Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane (FIOCRUZ-Amazonas), Manaus, Brazil.

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus is the causative agent of the disease known as COVID-19. Despite the development of already approved vaccines, it is still a threat to public health worldwide. During the pandemic period, there was no medicine with scientific proof against COVID-19, against its effects, symptoms and antivirals. The objective was to determine and compare CQ concentrations in blood and nasal swabs during follow-up days D1, D5 and D7. The study involved 41 individuals, following the inclusion criteria, over 18 years old; hospitalized with clinical or epidemiological suspicion of Covid-19; and who has: respiratory rate >24 bpm AND/OR, heart rate >125 bpm (in the absence of fever) AND/OR, peripheral oxygen saturation <90% on room air AND/OR, shock (defined as MAP<65 mmHg, in need of vasopressors or oliguria or lowered level of consciousness), patients who used Chloroquine; no history of hypersensitivity to one of the drugs used in the study; positive patients at the inclusion visit, where only 26 subjects were eligible. Mean CQ concentrations (standard deviation) for swab samples were: 0.3183 μ M (0.5175 μ M), 0.3215 μ M (0.4197 μ M) and 0.2369 μ M (0.1502 μ M), and for plasma samples were: 0.7382 μ M (0.9311 μ M), 5.753 μ M (2.77 μ M) and 6.181 μ M (3.594 μ M). Comparison between mean CQ concentrations at visits on D1, D5 and D7, only Plasma samples showed significant differences (*p-value* <0.0001). Correlation analysis between CQ

concentrations vs follow-up days demonstrated strong correlations in D1 swab vs D7 swab samples ($r=0.647$, $p\text{-value}=0.005$), and in D7 vs D7 swab samples ($r=0.537$, $p\text{-value}= 0.018$), and in Swab D1 vs plasma D5 ($r= -0.489$, $p\text{-value}=0.021$). Correlating plasma CQ concentrations vs. CQ dose administered on follow-up days D1, D5 and D7, only visit D5 showed a positive and statistically significant correlation ($r= 0.5876$, $p\text{-value}= 0.0025$). Correlations between CQ swab concentration vs Ct value, only follow-up visits D1 and D5 showed strong negative correlations with statistically significant values ($r= -0.6258$, $p\text{-value}= 0.0095$) and respectively ($r= -0.6633$, $p\text{-value} = 0.0515$). The correlations between DesethylCQ and the concentration of CQ in the plasma samples on all follow-up days showed correlation and with a significant value, however for the Swab samples only visit D7 showed a significant correlation. The CQ concentrations expressed wide variability for swab samples, due to their very low concentrations, possibly swab samples are not a good alternative for pharmacokinetic determination of the drug. Evaluating concentrations and PCR, the drug was possibly not able to accelerate the negative results of the samples on the follow-up days.

INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, is a major health problem worldwide (1,2). Worldwide, as of January 30, 2023, there are 752,517,552 confirmed cases of COVID-19 with 6,804,491 deaths (3). Due to the high impact and rapid spread of the disease. Drugs already established for other diseases were used in an attempt to contain the infection by Covid-19 (4). Among the candidates, chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ), which have shown promising antiviral properties *in vitro* experiments and were considered for use in patient care (2,5). Based on results demonstrating *in vitro* antiviral properties, CQ has been widely and rapidly used as a treatment for COVID-19. However, clinical trials have reported that CQ lacks efficacy against COVID-19 (6-8).

CQ and HCQ are well-known 4-aminoquinoline antimalarial drugs, but they are used in the treatment of rheumatic diseases (7). Both have long half-lives and low blood clearance (9). After metabolization and distribution, both drugs can be detected in various body secretions, including saliva (10-14). Studies with other drugs also used saliva and plasma/serum samples for analysis of concentrations in the organism, they were used for anti-tuberculosis drugs (15), anti-epileptics (16-18) and immunosuppressants (19-22).

Sankowski 2022, for the drug monitoring method in blood samples, has some disadvantages, and proposed saliva as an alternative material for drug quantification, they use a commercial device for saliva collection, perform a comparison between two saliva collection methods, also comparing with plasma (23). This work aimed to determine whether CQ could be detected in mucous secretions from the nasopharynx and oropharynx of patients infected with the SARS-CoV-2 virus and receiving CQ as a treatment regimen.

METHODS

This study was submitted and approved on the Brazil platform in December 2020, under the CAAE number: 39745120.1.0000.0005.

This study used samples between March to April 2020, from a retrospective cohort of patients. The study began on March, 2020 and the individuals were hospitalized with severe acute respiratory syndrome related to COVID-19 at Hospital e Pronto Socorro Delphina Rinaldi Abdel Aziz (HPSDRA), a reference center for the management of Covid-19 in the city of Manaus, capital of the State of Amazonas (24). Inclusion criteria were: >51 years OR, pre-existing lung disease OR, decompensated chronic kidney disease OR, decompensated diabetes OR, systemic arterial hypertension OR, cardiovascular disease OR, use of immunobiological drugs OR, use of immunosuppressive drugs OR, patients with HIV/AIDS (CD4+ lymphocytes below 250) OR, cancer. In addition, the patient must be hospitalized, and with one of the following conditions: respiratory rate >24 bpm OR, heart rate > 125 bpm (in the absence of fever) OR, peripheral oxygen saturation <90% in room air OR, shock (defined as MAP <65 mmHg, requiring vasopressor or oliguria or lowered level of consciousness).

From the patients admitted at HPSDRA, 41 individuals were randomized to be treated with 600mg of CQ daily for 10 days (25). These patients were followed up all days of treatment, whereby blood, oropharyngeal and nasopharyngeal samples were collected on days 1, 5 and 7.

In the oropharyngeal and nasopharyngeal samples, CQ, desethylchloroquine (DCQ) and HCQ concentrations were estimated by high performance liquid chromatography (HPLC) on days 1, 5 and 7 by HPLC (26).

For SARS-CoV-2 detection and viral quantification, viral RNA was extracted from the swab collected samples using the Abbott 2000sp platform (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) following the manufacturer's instructions. The samples were then

analyzed using the Biomol OneStep/COVID-19 kit (Institute of Molecular Biology of Paraná, Curitiba, PR, Brazil) in an Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System (27).

All tests have a 95% confidence level, for qualitative variables, X^2 tests and Fisher exact tests were performed. We used the t test or Mann-Whitney test to compare means and medians, for the multivariate analyses, the nonparametric kruskal-Willis test was used. Statistical analyzes were performed in Stata/MP version 14.0.

RESULTS

Population characteristics

As presented in the Figure 1, a total of 41 participants with clinical and epidemiological presentation compatible with COVID-19 were included in the study. It was noted that 26 participants (68.4%) tested positive for the SARS-CoV-2 virus. The 26 participants were selected for further analysis.

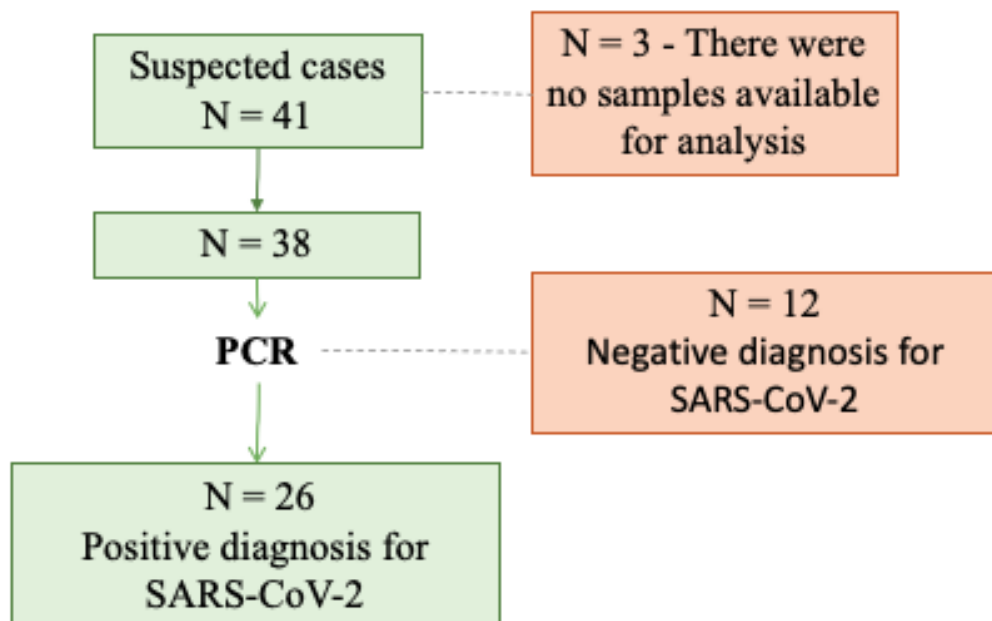


Figure 1: flowchart study participants

The primary characteristics are shown in Table 1. It was observed that male participants were predominant with 76.9%; the mean age was 55.5 years; weighing on average 84.1 kgs and over 70% declared to be of admixed ethnicity. Additionally, 88.5% reported that had some pre-existing comorbidity, which hypertension was most common

(47.8%), followed by obesity (34.8%) and alcohol use disorder (30.4%) (Table 2). At the time of admission, most of the participants revealed to have been using or had used other medications apart from CQ (84.6%) (Table 3). Antibiotics were the most frequently (72.7%) used medications among the participants, followed by dipyrone with 59.1% and proton pump inhibitors with 45.5%. Statistical analysis showed that there weren't significant differences in age, weight and time from onset of symptoms to admission between the genders ($p>0.05$). However, there was a statistically significant difference in the mean body mass index of the participants by gender ($p=0.0038$).

Table 1: Demographic characteristics of 26 patients treated at HPSDRA, in April 2020.

Variable	N/Total N (%) Total (N=26)
Gender	
Male	20/26 (76.9)
Female	6/26 (23.1)
Age – years	
Mean (SD)	55.5 (12.4)
Median (IQR)	56.5 (34 - 64)
Range (years)	34.0 - 84
Weight	
Mean (SD)	84.1 (21.7)
Range (Kg)	50 – 160.1
BMC, Kg/m ²	
Mean (SD)	29.9 (7.9)
Range	19.5 – 58.8
Race – N (%)	
White	4/26 (15.4)
Brown	19/26 (73.1)
Black	3/26 (11.5)
Professional Healthcare Worker – N (%)	
Yes	4/26 (15.4)
No	22/26 (84.6)
Pregnant – N (%)	
No	6/6 (100)
Time from symptom onset to admission, Days	
Mean (SD)	9.69 (8.5)
Range (Days)	1 – 46

Table 2: Clinical and medical history of patients at baseline.

<i>Comorbidities</i>	<i>N/ Total N (%)</i> <i>Total (N-26)</i>
<i>Yes</i>	<i>23/26 (88.5)</i>
<i>No</i>	<i>2/26 (7.7)</i>
<i>Hypertension</i>	<i>11/23 (47.8)</i>
<i>Obesity</i>	<i>8/23 (34.8)</i>
<i>Alcoholism:</i>	
<i>Alcoholic</i>	<i>7/23 (30.4)</i>
<i>Ex-alcoholic</i>	<i>2/23 (8.1)</i>
<i>Tee toller</i>	<i>12/23 (52.2)</i>
<i>Unknown</i>	<i>2/23 (8.1)</i>
<i>Smoking:</i>	
<i>Smoker</i>	<i>2/23 (8.1)</i>
<i>Ex-smoker</i>	<i>6/23 (26.1)</i>
<i>Non-smoker</i>	<i>12/23 (52.2)</i>
<i>Unknown</i>	<i>3/23 (13.0)</i>
<i>Diabetes mellitus</i>	<i>5/23 (21.7)</i>
<i>Chronic renal disease</i>	<i>4/23 (17.4)</i>
<i>Chronic pulmonary disease</i>	<i>4/23 (17.4)</i>
<i>Chronic cardiac disease</i>	<i>3/23 (13.0)</i>

Table 3: Medical history of patients at baseline characteristics.

	<i>N / Total N (%)</i>
Medications	22 / 26 (84.62)
Ibuprofen	1/22 (4.76)
Corticoids	2/22 (9.52)
Antibiotics:	16/22 (72.73)
Azithromycin	8/16 (53.33)
*other antibiotics	15/16 (93.75)
(*ceftriaxone most common 14/15= 93.33%)	
Bronchodilators (fenoterol, ipatrópio)	3/22 (13.64)
Ace inhibitors (captopril – 80%)	5/22 (22.73)
Statin (all used simvastatin)	3/22 (13.64)
Arvs	0/22 (0.0)
Calcium blockers	0/22 (0.0)
Others	
*dipyronne appears most 59.09%	22/22 (100)
*proton pump inhibitors 45.45%	

Table 4: Average dose of CQ ingested by participants for each kg.

Variable	Mean (mg)	Std. Dev. (Min - Max)
Dose/ kg – D1	5.4	4.2 (0 – 15)
Dose/ kg – D5	5.1	5.6 (0 – 18.5)
Dose/ kg – D7	1.9	4.0 (0 – 14.1)
Dose cumulativa / kg	42.4	26.5 (6.3 – 108.0)

The average doses administered per kg are presented in Table 4, for D1 visits we obtained an average of 5.4 mg/kg, for D5 the average was 5.1 mg/kg, and later for D7 it was 1.9 mg /kg, Cumulative dose was calculated with the sum of all pills administered from D1 to D7 with an average of 42.4 mg/kg, distributed over 7 days the daily dose/kg was 6mg/kg.

Laboratory results

Table 5 shows the positivity of the Swab samples analyzed on D1, D5 and D7, divided into two groups: individuals who were included in the first 7 days from the onset of symptoms (Group A) and individuals included with more than 7 days (Group B). On days 5 and 7 of patient follow-up, participants in Group A still had a higher viral positivity test compared to Group B. This difference in the two groups of participants was further supported by **Error! Reference source not found.**, which suggested a high burden viral between the individuals of Group A compared to Group B, for visits of D5 (p -value = 0.4) and D7 (p -value = 0.04), however, only in the comparison of groups of D7 showed the difference significant. The graphs of CT values illustrated lower averages in the number of cycles for individuals in Group A.

Table 5: PCR positivity in the groups greater and less than 7 days of symptoms

Days since symptoms	Group	PCR results	% (N./N. total)		
			D1	D5	D7
A <7		Pos	100 (11/11)	77,8 (7/9)	87,5 (7/8)
		Neg	0	22,2 (2/9)	12,5 (1/8)
B >7		Pos	100 (15/15)	41,7 (5/12)	45,5 (5/11)
		Neg	0	58,3 (7/12)	54,5 (6/11)
Total		Pos	100 (26/26)	57,1 (12/21)	63,2 (12/19)
		Neg	0	42,9 (9/21)	36,8 (7/19)

CQ concentration analysis is shown in Table 6 and Figure 2. In the Swab samples, a mean (SD) of CQ concentration, on days 1, 5 and 7 were 0.3183 μ M (0.5175), 0.3215 μ M (0.4197) and 0.2369 μ M (0.1502), respectively. In plasma, were found 0.7382 μ M (0.9311), 5.753 μ M (2.77), and 6.181 μ M (3.594), respectively. We didn't observe statistically significant differences in CQ concentrations between PCR positive and PCR negative participants on D5 and D7 (Table 6).

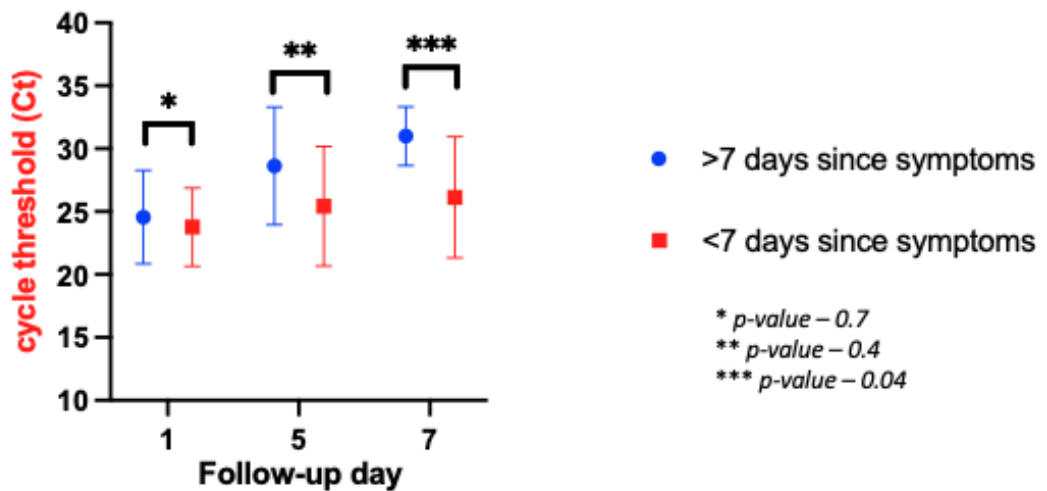


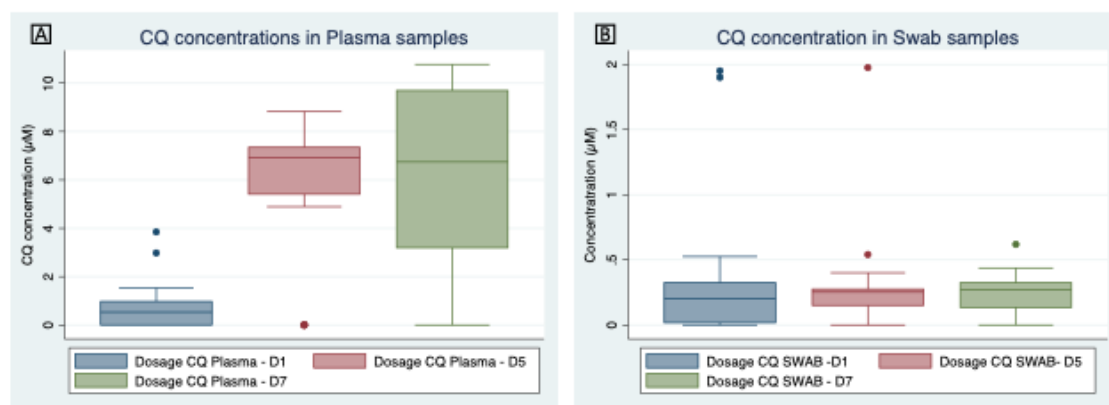
Figure 2: PCR Cycle threshold (Ct) value trend in patients with symptoms for under or over 7 days before admission.

Table 6: CQ concentration in swab and plasma samples (mean [SD]), days of follow-up; comparison of means of CQ concentration with corresponding day and PCR result (p-value).

Follow-up days	SWAB			PLASMA		
	D1	D5	D7	D1	D5	D7
Number (N)	24	29	19	26	20	17
Mean concentration (SD), μM	0.3183 (0.5175)	0.3215 (0.4197)	0.2369 (0.1502)	0.7382 (0.9311)	5.753 (2.77)	6.181 (3.594)
Range	0 – 1.95	0 – 1.97	0 – 0.61	0 – 3.8	0 – 8.8	0 – 10.78
<i>p</i> -value (by comparing with corresponding day PCR results)	*	0.1156	0.8970	*	0.3159	0.5539

* it was not possible to analyze

There was no significant difference between the mean CQ concentrations in the Swab at visits D1, D5 and D7 ($p < 0.05$). However, in the plasma, were significant differences from the same follow-up days (D1, D5, and D7) (p -value < 0.0001). A post hoc test indicated that there are significant differences in CQ concentrations between D1 and D5 and D1 and D7 (p -value < 0.0001).



(A) Concentration of CQ in plasma sample; (B) concentration of CQ in Swab samples; for both samples in blue the average of the samples referring to D1 is shown, in red D5 and in green D7.

Figure 3: Chloroquine concentration in samples analyzed on follow-up days (mean [SD]), (A) Concentration of CQ in plasma sample; (B) concentration of CQ in Swab samples; for both samples in blue the average of the samples referring to D1 is shown, in red D5 and in green D7.

Figure 4 shows the correlation between plasma CQ concentrations vs CQ dose administered on D1, D5 and D7. A Figure 4B It was observed that there was a statistically significant positive correlation between the dose of CQ administered and the plasma concentrations of CQ ($r: 0.5876^*$, $p= 0.0025$).

Figure 5 demonstrates that the negative correlation between CQ Swab concentrations vs Ct value in the analyzed visits, however between correlations only for follow-up days D1 and D5 were statistically significant between Ct value and CQ concentration in the sample with ($r: -0.6258$, $p\text{-value} = 0.0095$ and $r: -0.6633$, $p\text{-value} = 0.0515$).

Correlation between CQ concentration in plasma samples on visit D7 and cumulative dose ingested, represented by Figure 6, where the coefficient showed a weak and non-significant correlation ($r=0.2717$, $p\text{-value}=0.2335$), In Figure 6 we can verify that there is possibly no correlation between CQ concentration vs cumulative ingested dose.

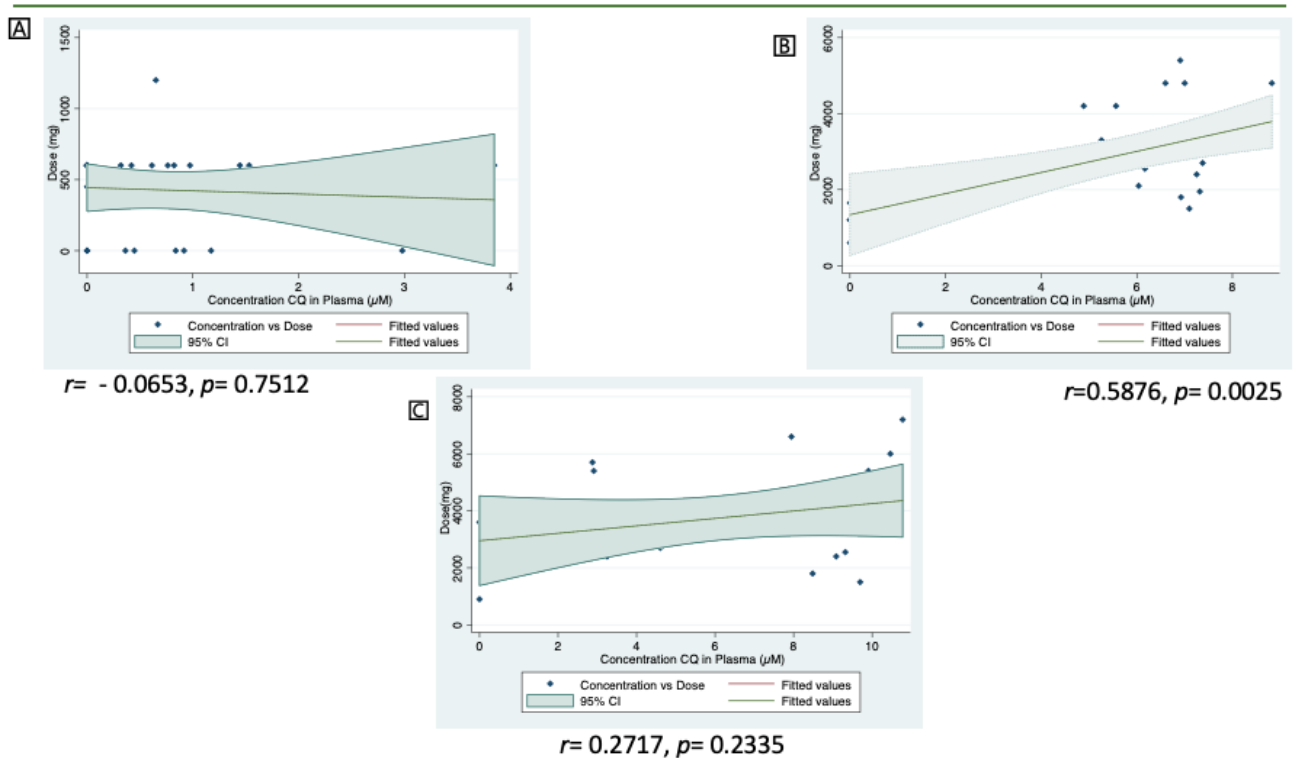
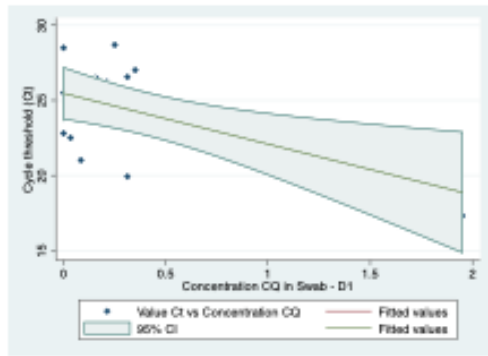
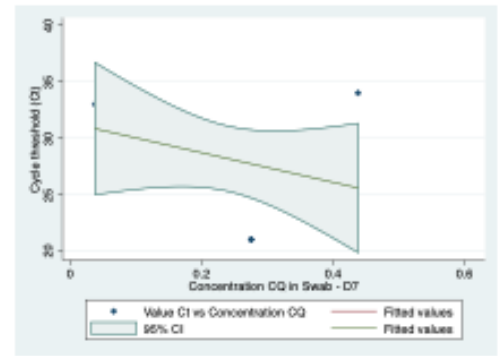


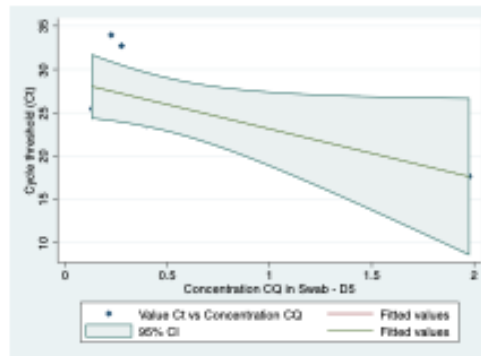
Figure 4: Correlation of administered doses vs plasma concentration; (A) correlation graph in D1 samples; (B) correlation graph in D5 samples; (C) correlation graph in D7 samples.



$r = -0.6258$, $p\text{-value} = 0.0095$

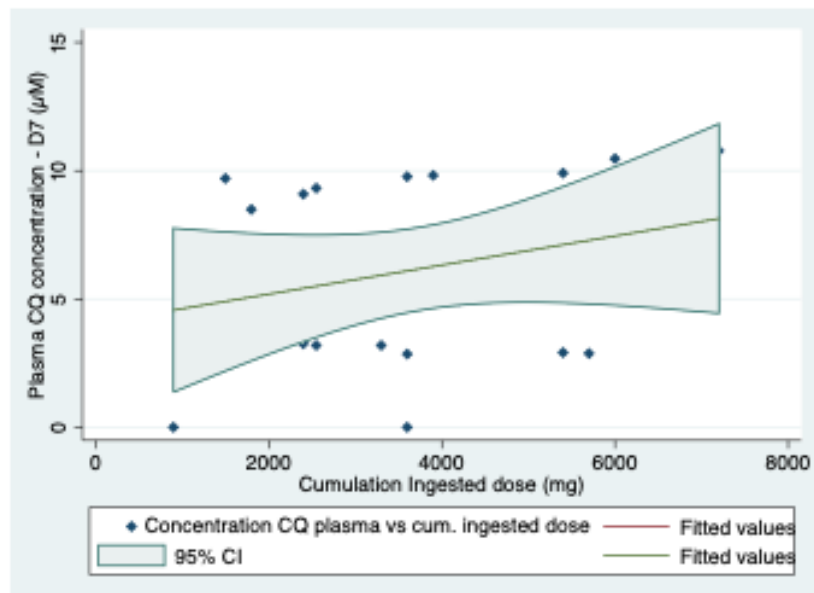


$r = -0.6633$, $p\text{-value} = 0.2711$



$r = -0.6633$, $p\text{-value} = 0.0515$

Figure 5: Correlation of Ct value vs CQ concentration in Swab's; (A) correlation graph in D1 samples; (B) correlation graph in D5 samples; (C) correlation graph in D7 samples.



$r = 0.2717$, $p\text{-value} = 0.2335$

Figure 6: Correlation of plasma CQ concentration at visit D7 vs cumulative ingested dose.

Evaluating DCQ and correlating with CQ concentration in plasma and Swab samples (Table 8). Plasma samples at visits D1 and D7 showed significant correlations, for swab samples D7 and plasma D5 showed moderate and significant correlation.

Table 7: Correlation of DesethylCQ concentration in plasma samples versus CQ concentration for both samples on different days.

Variables	correlation coefficient (<i>r</i>)	<i>p</i> -Value
* Bioavailability (DCQ)		
Bioavailability - D1 vs CQ concentration in plasma - D1	0.9566*	<0.0001*
Bioavailability - D5 vs CQ concentration in plasma - D5	0.5976*	0.0054*
Bioavailability - D7 vs CQ concentration in plasma - D7	0.9789*	<0.0001*
Bioavailability - D1 vs CQ concentration in Swab - D1	0.0394	0.8849
Bioavailability - D5 vs CQ concentration in Swab - D5	-0.1437	0.5573
Bioavailability - D7 vs CQ concentration in Swab - D7	0.5729*	0.0103*

Table 8: Correlation between Comorbidities and the concentration of CQ in plasma samples.

Variables	Plasma Day 1		Plasma Day 5		Plasma Day 7	
	correlation coefficient (<i>r</i>)	<i>p</i> -Value	correlation coefficient (<i>r</i>)	<i>p</i> -Value	correlation coefficient (<i>r</i>)	<i>p</i> -Value
Comorbidity	0.0388	0.860	0.0447	0.604	0.0134	0.835
Obesity	0.3281	0.251	0.5514	0.153	0.0079	0.938
Hypertension	-0.6554	0.237	0.0628	0.648	-0.1275	0.153
Diabetes	-0.3682	0.580	0.2397	0.441	-0.0044	0.972
Heart disease	-0.6305	0.561	0.1874	0.659	0.0451	0.787
Pulmonary diseases	-0.2232	0.734	0.2565	0.477	-0.1186	0.398
Chronic kidney disease	0.4397	0.241	-0.1505	0.394	-0.0338	0.834
Liver diseases	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Chronic neurological diseases	0.2840	0.734	-3.0686	0.992	ND	ND
Rheumatic diseases	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 9: Correlation between Comorbidities and the concentration of QC in Swabs samples

Variables	Swab Day 1		Swab Day 5		Swab Day 7	
	correlation coefficient (<i>r</i>)	Valor- <i>p</i>	correlation coefficient (<i>r</i>)	Valor- <i>p</i>	correlation coefficient (<i>r</i>)	Valor- <i>p</i>
Comorbidity	-0.2864	0.583	0.0153	0.979	0.5078	0.748
Obesity	-1.2929	0.513	-1.5288	0.470	-2.9820	0.312
Hypertension	-2.1451	0.311	-0.8498	0.547	-2.3064	0.365
Diabetes	-4.2301	0.310	-0.2090	0.880	0.7786	0.798
Heart disease	-0.7540	0.786	-0.0944	0.957	2.4139	0.579
Pulmonary diseases	-0.7298	0.712	-1.2778	0.633	-1.9495	0.655
Chronic kidney disease	0.1643	0.881	0.3669	0.780	5.0907	0.217
Liver diseases	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Chronic neurological diseases	12.0849	0.992	ND	ND	ND	ND
Rheumatic diseases	ND	ND	ND	ND	ND	ND

For Table 8 and Table 9, correlations performed between comorbidities and the concentration of CQ, it demonstrated a wide variability in the correlation coefficient (*r*); no significant results were demonstrated for the analyzes carried out (*p*-value >0.05).

Discussion

Given the urgency to control and manage the COVID-19 pandemic, several medications have been tested against SARS-CoV-2 (4,5,28-44). Chloroquine has been used safely for more than 70 years in the treatment of malaria, and also demonstrated potential antiviral activity to SARS-CoV-2 *in vitro*, it could be an effective treatment (45). The Guangdong Province Health Commission recommended the use of CQ in a dose of 500 mg twice daily for 10 days to reduce viral load, shorten hospital stay and improve patient outcomes (46). However, Borba *et al.* (2020) demonstrated that the risks of high dose CQ treatment outweighed the possible benefits (24).

Chen *et al.* (2020) and Huang *et al.* (2020) (47,48), where the number of infections was higher in men. The females were less affected because the female immune system has reduced susceptibility due to genetic and hormonal factors (48,49). Data have shown that most of them had pre-existing comorbidities, studies have shown that individuals with comorbidities associated with COVID are at greater risk of worsening

and may even require admission to the ICU (50). Diabetes, obesity, hypertension, heart disease and others can be considered a risk factor for severity (50-52).

In this study, there was a reduction in the rate of positivity after the seventh day of symptom onset. These findings corroborated those of Xiao *et al.* (2020), who described there was a greater positivity within the first 7 days (53).

In 1983, a case of CQ intoxication was published which a dose of 82 mg/kg body weight with blood concentrations of approximately 10.0 μM , could be tolerated. Some dose-dependent symptoms manifested following the administration of CQ, which subsided with reducing blood CQ concentrations (54).

After the study demonstrated *in vitro* activity of CQ for SARS-CoV-2, Wang *et al.* (2020) recommended that they be used in humans (5). It was expected that CQ would reduce virus positivity rates and that CQ concentrations in swabs would be close to reported *in vitro* concentrations. However, our results suggest that the “therapeutic” concentration was unattainable mainly at the desired site of action (nasal, oral mucosa and nasopharyngeal lining). On the other hand, serum concentrations were higher than the EC50 discussed by (5), and the values considered effective by (45). It can also be observed that the values of concentrations in the swab samples did not reach even half of the value suggested by Wang in 2020 (5).

Regarding the Swab samples, it was observed that the CQ concentration did not differ even with daily administration. On the other hand, plasma drug concentration increased over the follow-up days.

A correlation was observed between Ct and CQ concentration, it was observed that as concentrations increase, there is no reduction in viral load, as Ct values decrease with disease progression, suggesting a greater amount of virus in the sample.

The study had some limitations. First, the place where the participants were recruited was a reference center for severe and critical cases of COVID-19, making it impossible to include mild and moderate cases as a comparison in the study.

Furthermore, the use of CQ as a treatment was discontinued after 5 days of treatment due to safety concerns for participants. Finally, due to the suspension of the use of the CQ due to the safety of individuals, the sample size was affected. Between

for correlation chart of ct value vs CQ concentration, it can be suggested that as the concentrations increase, they do not reduce the virus load, since Ct values are reduced with the progression of the disease, suggesting a greater amount of virus in the sample.

The study had some limitations. First, the place of recruitment of participants was a referral center for severe and critical cases of COVID-19, making it impossible to include mild and moderate cases as comparative groups in the study. Second, the use of CQ as a treatment was discontinued after 5 days of treatment, due to safety concerns for participants. Finally, due to the suspension of the use of the CQ for reasons of safety of the individuals, the sample size was affected.

Conclusion

CQ concentrations were different between swab and plasma. Sufficient swab concentrations did not reach concentration as suggested *in vitro* tests. Correlations of Ct value vs CQ concentration suggest that even with maintenance doses of the drug, the viral amount continues to increase. As for the blood concentrations, they exceeded these values, but not enough to reduce the viral load. Comorbidities did not influence the concentration of drug concentrations in people arriving. Due to the large variability in the Swab sample, and the low CQ concentration, the Swab is probably not a good alternative sample for pharmacokinetic drug development. Future studies need to be performed regarding adverse effects, drug metabolizers and pharmacological immunomodulation.

References

1. Du Toit A. Outbreak of a novel coronavirus. Vol. 18, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2020. p. 123.
2. Di Gennaro F, Pizzol D, Marotta C, Antunes M, Racalbuto V, Veronese N, et al. Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: A narrative review. Int J Environ Res Public Health. 2020 Apr;17(8).
3. Johns Hopkins University & Medicine. Covid-19 map - Johns Hopkins Coronavirus REsource center [Internet]. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. 2022 [cited 2022 Mar 29]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/region/brazil>
4. Beck BR, Shin B, Choi Y, Park S, Kang K. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Jan;18:784–90.
5. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in

vitro. *Cell Res* [Internet]. 2020 Mar 4;30(3):269–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41422-020-0282-0>

6. Iyer M, Jayaramayya K, Subramaniam MD, Lee S Bin, Dayem AA, Cho SG, et al. COVID-19: An update on diagnostic and therapeutic approaches. *BMB Rep*. 2020;53(4):191–205.
7. Nicol MR, Joshi A, Rizk ML, Sabato PE, Savic RM, Wesche D, et al. Pharmacokinetics and Pharmacological Properties of Chloroquine and Hydroxychloroquine in the Context of COVID-19 Infection. Vol. 108, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2020. p. 1135–49.
8. Gupta A, Malviya A. Chloroquine and hydroxychloroquine for COVID-19: time to close the chapter. *Postgrad Med J*. 2020 Aug;
9. Babayeva M, Loewy Z. Repurposing drugs for COVID-19: Pharmacokinetics and pharmacogenomics of chloroquine and hydroxychloroquine. *Pharmgenomics Pers Med*. 2020 Oct;13:531–42.
10. Ette EI, Essien EE, Brown-Awala EE. Pharmacokinetics of chloroquine: Saliva and plasma levels relationship. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1986 Oct;11(4):275–81.
11. Ogunbona FA, Onyeji CO, Lawal AA, Chukwuani CM, Bolaji OO. Liquid chromatographic analysis of chloroquine and desethylchloroquine in human plasma, saliva and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1986;380(C):425–30.
12. Onyeji CO, Ogunbona FA. Time-dependent variability of chloroquine secretion into human saliva. *Pharm World Sci*. 1996;18(6):211–6.
13. Ogunbona FA, Lawal AA, Onyeji CO. Saliva secretion of chloroquine in man. *J Pharm Pharmacol*. 1986;38(7):535–7.
14. Ahn BY, Kang CK, Seo J Do, Choe PG, Song SH, Park WB, et al. A case of breakthrough COVID-19 during hydroxychloroquine maintenance. *J Korean Med Sci*. 2020;35(24):1–5.
15. van den Elsen SHJ, Oostenbrink LM, Heysell SK, Hira D, Touw DJ, Akkerman OW, et al. Systematic Review of Salivary Versus Blood Concentrations of Antituberculosis Drugs and Their Potential for Salivary Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2018 Feb;40(1):17–37. Available from: <https://journals.lww.com/00007691-201802000-00003>

16. Kim D, Moon J, Shin Y, Lee S, Jung K, Park K, et al. Usefulness of saliva for perampanel therapeutic drug monitoring. *Epilepsia* [Internet]. 2020 Jun 7;61(6):1120–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.16513>
17. Brandt C, Bien CG, Helmer R, May TW. Assessment of the correlations of lacosamide concentrations in saliva and serum in patients with epilepsy. *Epilepsia* [Internet]. 2018 Apr;59(4):e34–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.14023>
18. Grim SA, Ryan M, Miles M V., Tang PH, Strawsburg RH, DeGrauw TJ, et al. Correlation of Levetiracetam Concentrations Between Serum and Saliva. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2003 Feb;25(1):61–6. Available from: <http://journals.lww.com/00007691-200302000-00009>
19. Wiesen MHJ, Farowski F, Feldkötter M, Hoppe B, Müller C. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in saliva and plasma using a standardized saliva collection device. *J Chromatogr A* [Internet]. 2012 Jun;1241:52–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731200550X>
20. Mendonza A, Gohh R, Akhlaghi F. Determination of Cyclosporine in Saliva using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2004 Oct;26(5):569–75. Available from: <http://journals.lww.com/00007691-200410000-00016>
21. Ghareeb M, Gohh RY, Akhlaghi F. Tacrolimus Concentration in Saliva of Kidney Transplant Recipients: Factors Influencing the Relationship with Whole Blood Concentrations. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2018 Sep 12;57(9):1199–210. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-017-0626-1>
22. Shen B, Li S, Zhang Y, Yuan X, Fan Y, Liu Z, et al. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC–MS/MS method: Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2009 Oct;50(3):515–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509003446>
23. Sankowski B, Michorowska S, Raćkowska E, Sikora M, Giebułtowiec J. Saliva as Blood Alternative in Therapeutic Monitoring of Teriflunomide—Development and Validation of the Novel Analytical Method. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).
24. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for

Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw open*. 2020;3(4):e208857.

25. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. Chloroquine diphosphate in two different dosages as adjunctive therapy of hospitalized patients with severe respiratory syndrome in the context of coronavirus (SARS-CoV-2) infection: Preliminary safety results of a randomized, double-blinded, phase IIb cl. medRxiv. 2020;

26. Dua VK, Kar PK, Gupta NC, Sharma VP. Determination of chloroquine and desethylchloroquine in plasma and blood cells of Plasmodium vivax malaria cases using liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 1999;21(1):199–205.

27. Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System [Internet]. [cited 2022 May 10]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4365464?SID=srch-srp-4365464>

28. Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med*. 2020;48(3):737–62.

29. Wang Z, Chen X, Lu Y, Chen F, Zhang W. Clinical characteristics and therapeutic procedure for four cases with 2019 novel coronavirus pneumonia receiving combined Chinese and Western medicine treatment. *Biosci Trends*. 2020;14(1).

30. Deng L, Li C, Zeng Q, Liu X, Li X, Zhang H, et al. Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against Corona Virus Disease 2019: A retrospective cohort study. *J Infect*. 2020 Jul;81(1):e1–5.

31. Wang Z, Yang B, Li Q, Wen L, Zhang R. Clinical Features of 69 Cases With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul;71(15):769–77.

32. Duan Y, Zhu HL, Zhou C. Advance of promising targets and agents against COVID-19 in China. *Drug Discov Today*. 2020 May;25(5):810–2.

33. Du YX, Chen XP. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clin Pharmacol Ther*. 2020 Aug;108(2):242–7.

34. Costanzo M, De Giglio MAR, Roviello GN. SARS-CoV-2: Recent Reports on Antiviral Therapies Based on Lopinavir/Ritonavir, Darunavir/Umifenovir, Hydroxychloroquine, Remdesivir, Favipiravir and other Drugs for the Treatment of the New Coronavirus. *Curr Med Chem*. 2020 Apr;27(27):4536–41.

35. Bernal-Bello D, Jaenes-Barrios B, Morales-Ortega A, Ruiz-Giardin JM, García-Bermúdez V, Frutos-Pérez B, et al. Imatinib might constitute a treatment option for lung involvement in COVID-19. *Autoimmun Rev.* 2020 Jul;19(7).
36. Morales-Ortega A, Bernal-Bello D, Llarena-Barroso C, Frutos-Pérez B, Duarte-Millán MÁ, García de Viedma-García V, et al. Imatinib for COVID-19: A case report. *Clin Immunol.* 2020 Sep;218:108518.
37. Kang S, Peng W, Zhu Y, Lu S, Zhou M, Lin W, et al. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 May;55(5):105950.
38. Javorac D, Grahovac L, Manić L, Stojilković N, Anđelković M, Bulat Z, et al. An overview of the safety assessment of medicines currently used in the COVID-19 disease treatment. *Food Chem Toxicol.* 2020 Oct;144:111639.
39. Dong L, Hu S, Gao J. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov Ther.* 2020 Feb;14(1):58–60.
40. Du B, Qiu HB, Zhan X, Wang YS, Kang HYJ, Li XY, et al. [Pharmacotherapeutics for the new coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2020;43(3):173–6.
41. Qiu H, Wu J, Hong L, Luo Y, Song Q, Chen D. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jun;20(6):689–96.
42. Yuan J, Zou R, Zeng L, Kou S, Lan J, Li X, et al. The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflamm Res.* 2020 Jun;69(6):599–606.
43. Xu P, Huang J, Fan Z, Huang W, Qi M, Lin X, et al. Arbidol/IFN- α 2b therapy for patients with corona virus disease 2019: a retrospective multicenter cohort study. *Microbes Infect.* 2020 May;22(4–5):200–5.
44. Elfiky AA. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci.* 2020 May;248.
45. Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Neyts J, Ranst M Van. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(1):264–8.

46. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. [Expert consensus on chloroquine phosphate for the treatment of novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2020 Mar;43(3):185–8.
47. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10223):507–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
48. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
49. Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Jun;56(3):308–21.
50. Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, Javed H, Junaid K, Abdalla AE, et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. *J Infect Public Health* [Internet]. 2020 Dec;13(12):1833–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876034120305943>
51. Kompaniyets L, Pennington AF, Goodman AB, Rosenblum HG, Belay B, Ko JY, et al. Underlying Medical Conditions and Severe Illness Among 540,667 Adults Hospitalized With COVID-19, March 2020–March 2021. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2021 Jul 1;18:210123. Available from: http://www.cdc.gov/pcd/issues/2021/21_0123.htm
52. Adab P, Haroon S, O’Hara ME, Jordan RE. Comorbidities and covid-19. *BMJ*. 2022;19–20.
53. Xiao AT, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang YJ, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *J Clin Virol* [Internet]. 2020;127:104346. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104346>
54. Frisk-Holmberg M, Bergqvist Y, Englund U. Chloroquine intoxication. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 1983;15:502–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1427797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

6. CONCLUSÃO

As concentrações de CQ foram diferentes entre o swab e o plasma. As concentrações no swab não atingiram concentração suficiente conforme sugerido nos testes *in vitro*. As correlações de Ct vs concentração CQ sugere que mesmo com as doses de manutenção da droga, a quantidade viral continua crescente. Já para as concentrações sanguíneas que apesar de ultrapassaram esses valores, não foram suficientes para reduzir a carga viral. As Comorbidades não demonstraram ter influência nas concentrações da droga. Devido grande variabilidade na amostra de swab, e apresentar concentração da CQ baixa, provavelmente o swab não é uma boa amostra alternativa para determinação farmacocinética da droga. Estudos futuros precisam ser realizados em relação aos efeitos adversos, metabolizadores de drogas e imunomodulação farmacológica.

7. LIMITAÇÕES

O estudo teve algumas limitações. Primeiro, o local de recrutamento dos participantes foi um centro de referência para casos graves e críticos de COVID-19, impossibilitando a inclusão de casos leves e moderados como grupos comparativos no estudo. Em segundo lugar, o uso de CQ por 10 dias foi descontinuado, devido a preocupações de segurança para os participantes. Por fim, devido à suspensão do uso do CQ por questões de segurança dos indivíduos, o tamanho da amostra foi limitado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(6):439–50.
2. Drosten C, Preiser W, Günther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med.* 2003 Aug;9(8):325–7.
3. Peiris, JSM; Lai, ST; Poon, LLM; Guan, Y; Yam, LYC; Lim, W; Nicholls, J; Yee, WKS; Yan, WW; Cheung, MT; Cheng, VCC; Chan, KH; Tsang, DNC; Yung, RWH; Ng, TK; Yuen K. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361(Abril):1319–25.
4. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. *Virol J* [Internet]. 2015;12(1):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0439-5>
5. Kang S, Peng W, Zhu Y, Lu S, Zhou M, Lin W, et al. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 May;55(5):105950.
6. Lai MMC, Cavanaght D. THE MOLECULAR BIOLOGY OF CORONAVIRUSES. *Adv Virus Res.* 1997;48.
7. Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, Huang Y, Tsoi H-W, Wong BHL, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 Sep;102(39):14040–5.
8. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727–33.
9. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418–23.
10. van der Hoek L. Human coronaviruses, what do they cause? *Antivir Ther.* 2007;1–15.
11. Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People’s Republic of China, in February, 2003. *Lancet.* 2003 Oct;362(9393):1353–8.
12. Raj VS, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL. MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr Opin Virol.* 2014 Apr;5:58–62.
13. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016 Jun;24(6):490–502.
14. Tan W, Zhao X, Ma X, Wang W, Niu P, Xu W, et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. *China CDC Wkly.* 2020;2(4):61–2.
15. Painel da OMS sobre o coronavírus (COVID-19) [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 26]. Available from: <https://covid19.who.int/>
16. (Brasil) M da S. Coronavírus (Covid-19): Sobre a doença. 2020. p. 1.
17. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas Dra Rosemary Costa Pinto. CORONAVÍRUS. Situação Epidemiológica da Covid-19 no estado do Amazonas, 2021. 2021.
18. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas Dra Rosemary Costa Pinto. Boletim diário covid-19 no amazonas 20-03-2023 [Internet]. 20/03/2023. [cited 2023 Mar 26]. Available from: https://www.fvs.am.gov.br/media/publicacao/20_03_23_BOLETIM_DIARIO_DE_CASOS_COVID-19.pdf
19. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas Dra Rosemary Costa Pinto. Boletim diário covid-19 no amazonas 24/2/2023 [Internet]. 2023. Available from:

- https://www.fvs.am.gov.br/media/publicacao/24_02_23_BOLETIM_DIARIO_DE_CASOS_COVID-19.pdf
20. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med*. 2003 May;348(20):1967–76.
 21. Xu J, Zhao S, Teng T, Abdalla AE, Zhu W, Xie L, et al. Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*. 2020 Feb;12(2):244.
 22. Huang L-R, Chiu C-M, Yeh S-H, Huang W-H, Hsueh P-R, Yang W-Z, et al. Evaluation of antibody responses against SARS coronavirus nucleocapsid or spike proteins by immunoblotting or ELISA. *J Med Virol*. 2004 Jul;73(3):338–46.
 23. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Tsoi H -w., Fung AMY, Kao RYT, et al. Differential Sensitivities of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Polypeptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein ELISA for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3054–8.
 24. Younes N, Al-Sadeq DW, AL-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020 May;12(6):582.
 25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). 2020. p. 1.
 26. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2020 Jun 25;2. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013652>
 27. Wersom ESS., Motta LR., Bazzo ML, Franchini M, Ferreira; JODC. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Ministério da Saúde; Secr Vigilância em Saúde; Dep DST, Aids e Hepatites Virais [Internet]. 2013;5–55. Available from: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf
 28. MANUAL DO DIAGNÓSTICO COORDENAÇÃO ESTADUAL DE LABORATÓRIOS E PESQUISA EM VIGILÂNCIA. 2020;1–44. Available from: https://coronavirus.saude.mg.gov.br/images/profissionais-e-gestores/27-08_Manual_Diagnostico_Covid-19.pdf
 29. Matsuda EM, Campos IB, Oliveira IP, Colpas DR, Carmo AM dos S, Brígido LF de M. Field evaluation of COVID-19 antigen tests versus RNA based detection: Potential lower sensitivity compensated by immediate results, technical simplicity, and low cost. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Jul 8;93(7):4405–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8250877/pdf/JMV-93-4405.pdf>
 30. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Mar;27(3):472.e7-472.e10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20306972>
 31. WHO. Clinical management of COVID-19. 2020.
 32. Rai P. Detection technologies and recent developments in the diagnosis.pdf. 2021;441–55.
 33. Lee CY-P, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Apr 24;11:879. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32391022>

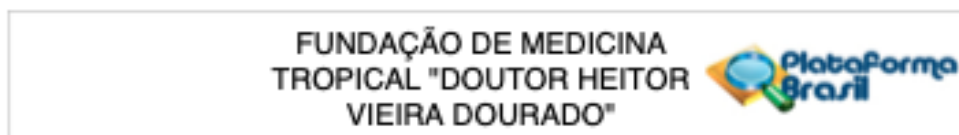
34. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020;25(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
35. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(18):1843–4.
36. Schwierzeck V, König JC, Kühn J, Mellmann A, Correa-Martínez CL, Omran H, et al. First reported nosocomial outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a pediatric dialysis unit. *Clin Infect Dis*. 2020 Apr;
37. Russel Higuchi, Gavin Dollinger PSW and RG. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992;10(Abril):413–7.
38. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199–207.
39. Du B, Qiu HB, Zhan X, Wang YS, Kang HYJ, Li XY, et al. [Pharmacotherapeutics for the new coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2020;43(3):173–6.
40. Qiu H, Wu J, Hong L, Luo Y, Song Q, Chen D. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):689–96.
41. Yuan J, Zou R, Zeng L, Kou S, Lan J, Li X, et al. The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflamm Res*. 2020 Jun;69(6):599–606.
42. Xu P, Huang J, Fan Z, Huang W, Qi M, Lin X, et al. Arbidol/IFN- α 2b therapy for patients with corona virus disease 2019: a retrospective multicenter cohort study. *Microbes Infect*. 2020 May;22(4–5):200–5.
43. Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med*. 2020;48(3):737–62.
44. Duan Y, Zhu HL, Zhou C. Advance of promising targets and agents against COVID-19 in China. *Drug Discov Today*. 2020 May;25(5):810–2.
45. Du YX, Chen XP. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clin Pharmacol Ther*. 2020 Aug;108(2):242–7.
46. Elfiky AA. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci*. 2020 May;248.
47. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* [Internet]. 2020 Mar 4;30(3):269–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41422-020-0282-0>
48. Javorac D, Grahovac L, Manić L, Stojilković N, Anđelković M, Bulat Z, et al. An overview of the safety assessment of medicines currently used in the COVID-19 disease treatment. *Food Chem Toxicol*. 2020 Oct;144:111639.
49. Costanzo M, De Giglio MAR, Roviello GN. SARS-CoV-2: Recent Reports on Antiviral Therapies Based on Lopinavir/Ritonavir, Darunavir/Umifenovir, Hydroxychloroquine, Remdesivir, Favipiravir and other Drugs for the Treatment of the New Coronavirus. *Curr Med Chem*. 2020 Apr;27(27):4536–41.
50. Beck BR, Shin B, Choi Y, Park S, Kang K. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Jan;18:784–90.
51. Ahsan W, Javed S, Bratty M Al, Alhazmi HA, Najmi A. Treatment of SARS-CoV-2: How far have we reached? *Drug Discov Ther*. 2020;14(2):67–72.

52. Chilamakuri R, Agarwal S. Covid-19: Characteristics and therapeutics. *Cells*. 2021;10(2):1–29.
53. Martinez MA. Plitidepsin: a Repurposed Drug for the Treatment of COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(4):22–4.
54. Rismanbaf A. Potential Treatments for COVID-19; a Narrative Literature Review. *Arch Acad Emerg Med*. 2020;8(1):e29.
55. Zhang X, Zhang Y, Qiao W, Zhang J, Qi Z. Baricitinib, a drug with potential effect to prevent SARS-COV-2 from entering target cells and control cytokine storm induced by COVID-19. 2020;(January).
56. Lo Caputo S, Corso G, Clerici M, Santantonio TA. Baricitinib: A chance to treat COVID-19? *J Med Virol*. 2020;92(11):2343–4.
57. Jorgensen SCJ, Tse CLY, Burry L, Dresser LD. Baricitinib: A Review of Pharmacology, Safety, and Emerging Clinical Experience in COVID-19. *Pharmacotherapy*. 2020;40(8):843–56.
58. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. Tixagevimab and Cilgavimab (Evusheld) for Pre-Exposure Prophylaxis of COVID-19. *JAMA [Internet]*. 2022 Jan 25;327(4):384. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2788354>
59. Wen W, Chen C, Tang J, Wang C, Zhou M, Cheng Y, et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. *Ann Med*. 2022;54(1):516–23.
60. Ministério da Saúde do Brasil. Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19 [Internet]. 2023 [cited 2023 Jan 15]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>
61. FIOCRUZ. CLOROQUINA: difosfato de cloroquina. Rio de Janeiro; 2017.
62. Maksymowych W, Russell AS. Antimalarials in rheumatology: Efficacy and safety. *Semin Arthritis Rheum*. 1987 Feb;16(3):206–21.
63. Wallace D. The use of chloroquine and hydroxychloroquine for non-infectious conditions other than rheumatoid arthritis or lupus: a critical review. *Lupus*. 1996 Jun;5(1_suppl):59–64.
64. McChesney EW. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *Am J Med*. 1983 Jul;75(1):11–8.
65. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):722–7.
66. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov*. 2020 Dec;6(1):16.
67. Savarino A, Di Trani L, Donatelli I, Cauda R, Cassone A. New insights into the antiviral effects of chloroquine. *Lancet Infect Dis*. 2006 Feb;6(2):67–9.
68. Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Neyts J, Ranst M Van. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(1):264–8.
69. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw open*. 2020;3(4):e208857.
70. Mackenzie AH. Pharmacologic actions of 4-aminoquinoline compounds. *Am J Med*. 1983 Jul;75(1):5–10.
71. Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine:

- implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. 2020 Mar;16(3):155–66.
72. Gustafsson L, Lindstrom B, Grahnén A, Alvan G. Chloroquine excretion following malaria prophylaxis. *Br J Clin Pharmacol*. 1987 Aug;24(2):221–4.
 73. Gustafsson L, Walker O, Alvan G, Beermann B, Estevez F, Gleisner L, et al. Disposition of chloroquine in man after single intravenous and oral doses. *Br J Clin Pharmacol*. 1983 Apr;15(4):471–9.
 74. Frisk-Holmberg M, Bergqvist Y, Termond E, Domeij-Nyberg B. The single dose kinetics of chloroquine and its major metabolite desethylchloroquine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1984;26(4):521–30.
 75. Augustijns P, Geusens P, Verbeke N. Chloroquine levels in blood during chronic treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;42(4):429–33.
 76. Cordonnier J, Van den Heede M, Heyndrickx A. Saliva Concentrations of Disopyramide Cannot Substitute the Drug's Plasma Concentrations. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1987 Jul 1;11(4):179–81. Available from: <http://academic.oup.com/jat/article/11/4/179/751146/Saliva-Concentrations-of-Disopyramide-Cannot>
 77. Sankowski B, Michorowska S, Raćkowska E, Sikora M, Giebułtowiec J. Saliva as Blood Alternative in Therapeutic Monitoring of Teriflunomide—Development and Validation of the Novel Analytical Method. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).
 78. Ahn BY, Kang CK, Seo J Do, Choe PG, Song SH, Park WB, et al. A case of breakthrough COVID-19 during hydroxychloroquine maintenance. *J Korean Med Sci*. 2020;35(24):1–5.
 79. Cochin M, Touret F, Driouich J-S, Moureau G, Petit P-R, Laprie C, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin used alone or combined are not effective against SARS-CoV-2 ex vivo and in a hamster model. *Antiviral Res* [Internet]. 2022 Jan;197:105212. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354221002023>
 80. Ministério da Saúde do Brasil. Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil. 2016. 64 p.
 81. INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP. KIT BIOMOL OneStep / COVID-19 KIT BIOMOL OneStep / COVID-19 [Internet]. 2020. Available from: https://www.ibmp.org.br/pt-br/wp-content/uploads/2020/05/Instrução-de-Uso-Kit-BIOMOL-OneStep_COVID-19-rev-02.pdf

9. ANEXOS E APÊNDICES

9.1. Parecer ético



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÕES LABORATORIAIS DAS CONCENTRAÇÕES DE DIFOSFATO DE CLOROQUINA EM PLASMA E SWAB NASOFARÍNGEO EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO NOVO CORONAVÍRUS (SARS-CoV-2) ATENDIDOS NO HOSPITAL E PRONTO SOCORRO DELPHINA RINALDI ABDEL AZIZ, NA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS, BRASIL.

Pesquisador: Rebeca Linhares de Abreu Netto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39745120.1.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.456.871

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer n. 4.430.282

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a cardiotoxicidade do Difosfato de Cloroquina e a influência da concentração do Difosfato de Cloroquina em Swab nasofaríngeo na viremia em pacientes adultos acometidos por infecção pelo coronavírus (SARS-CoV-2) atendidos no Hospital e Pronto-Socorro Delphina Rinaldi Abdel Aziz, Manaus, Amazonas.

Objetivo Secundário:

1. Verificar a frequência das alterações cardíacas em pacientes acometidos por infecção pelo coronavírus (SARS-CoV-2) antes da administração do Difosfato de Cloroquina (CQ);
2. Verificar a influência do tratamento com CQ nas alterações cardíacas em pacientes acometidos por infecção pelo coronavírus (SARS-CoV-2);
3. Comparar as concentrações da CQ e Desetil-cloroquina (DCQ) durante o seguimento entre

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmlam.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4-456/21

os grupos de alta e baixa dose de CQ;

4. Descrever a farmacocinética da cloroquina nos grupos de alta e baixa dose entre pacientes críticos e não críticos;
5. Verificar se existe associação entre polimorfismos das CYP2C8, CYP3A4 e CYP3A5 e a concentração de CQ e DCQ;
6. Verificar a associação entre a concentração plasmática de Difosfato de Cloroquina, Hidroxicloroquina e Desetil-cloroquina e a cardiotoxicidade nos pacientes com infecção por coronavírus (SARS-CoV-2);
7. Analisar a concentração de cloroquina em amostras de Swab orofaríngeo/nasofaríngeo e plasma nos visitas D1, D5 e D7;
8. Comparar concentração de cloroquina em amostras de Swab orofaríngeo/nasofaríngeo e plasma;
9. Verificar se existe associação de concentração de cloroquina no Swab orofaríngeo/nasofaríngeo e plasma com positividade de SARS-CoV-2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Reconhecemos que toda pesquisa envolvendo seres humanos, envolve risco (Resolução CNS nº 466 de 2012, item V).

O Risco da pesquisa é a "possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente". Os riscos inerentes ao presente projeto serão: divulgação de informações, invasão de privacidade; divulgação de dados confidenciais.

Para isso, todas as amostras coletadas para projetos com biorepositório aprovado estão anonimizados por códigos de inclusão e o sistema de cadastro dos dados dos participantes estão todos anonimizados. Além disso, garantimos que o material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo.

Benefícios:

A implementação de estudos da área básica altamente controlados, em um hospital comunidade com alta frequência de pacientes com COVID, pode levar a uma compreensão mais profunda das comorbidades associadas ao vírus, bem como a potenciais tratamentos contra a infecção viral, ou seja, a cloroquina. Portanto, os resultados encontrados pode trazer informações importantes

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3672 E-mail: cep@fml.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Contribuição do Pacient: 4.430.282

sobre o desfecho do tratamento de cloroquina para pacientes com COVID-19.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta às pendências geradas referente ao protocolo n. 4.430.282

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexada a esta plataforma apenas o documento
PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1652620_04-12-2020

Recomendações:

Vide Conclusões ou pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Resposta as pendências

Pendência

Para que se atenda a resolução 466/2012, solicita-se atentar para as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos:

Itens III da Resolução, conforme seguinte texto:

III - DOS ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

As pesquisas envolvendo seres humanos devem atender aos fundamentos éticos e científicos pertinentes.

III.1 - A eficácia da pesquisa implica em:

b) ponderação entre riscos e benefícios, tanto conhecidos como potenciais, individuais ou coletivos, comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos;

III.2 - As pesquisas, em qualquer área do conhecimento envolvendo seres humanos, deverão observar as seguintes exigências:

d) buscar sempre que prevaleçam os benefícios esperados sobre os riscos e/ou desconfortos previsíveis;

Diante do exposto solicita-se incluir os riscos e benefícios referentes a esta pesquisa.

Pendência Atendida

Pesquisador incluiu os riscos e benefícios inerente a pesquisa. Documento verificado.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3672 E-mail: cep@fimt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.495.871

Diante do exposto, vota-se pela Aprovação do projeto de pesquisa.

SMJ este é o parecer

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1552520.pdf	04/12/2020 12:31:58		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	28/10/2020 15:44:18	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_da_compromisso_TCUD.pdf	28/10/2020 12:41:15	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_dispenza_do_consentimento_TDCLE.pdf	28/10/2020 12:40:03	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_DE_PARTICIPACAO_LABCovid.pdf	28/10/2020 12:38:29	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_4004280_E2.pdf	28/10/2020 12:38:45	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3929646.pdf	28/10/2020 12:38:25	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_LABCovid.docx	28/10/2020 12:37:48	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_LABCovid.pdf	28/10/2020 12:37:02	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Declaração de Manuseio Material	armazenamento_analise amostra biologica_200320.pdf	28/10/2020 12:36:19	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmlam.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.456.871

Biológico / Biorepositório / Biobanco	armazenamento_analise_amostra_biol gica_200320.pdf	28/10/2020 12:36:19	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_D E_USO.pdf	28/10/2020 12:35:19	Rebeca Linhares de Abreu Netto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 11 de Dezembro de 2020

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: csp@fmlam.gov.br